

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019.

Ines Peremin

1167/BPI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019.

Ines Peremin

1167/BPI

**OPTIMIRANJE MIKSOTROFNOG  
I HETEROTROFNOG UZGOJA  
MIKROALGI I ISPITIVANJE  
UČINKOVITOSTI NJIHOVE  
BIOFLOKULACIJE POMOĆU  
PLIJESNI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek, u okviru znanstveno-istraživačkih projekata „Bioprospecting Jadranskog mora“, financiranog sredstvima Europskog fonda za regionalni razvoj (voditeljica projekta dr. sc. R. Čož Rakovac), i „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ (HRZZ-9717, voditelj projekta prof. dr. sc. B. Šantek).

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na savjetima i strpljenju te motivaciji tijekom izrade diplomskog rada, ali i cjelokupnog akademskog obrazovanja.*

*Također, zahvaljujem se mag. ing. Marini Grubišić i svim članovima Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na susretljivosti i ugodnoj atmosferi.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### OPTIMIRANJE MIKSOTROFNOG I HETEROTROFNOG UZGOJA MIKROALGI I ISPITIVANJE UČINKOVITOSTI NJIHOVE BIOFLOKULACIJE POMOĆU PLIJESNI

Ines Peremin, 1167/BPI

#### Sažetak:

Miksotrofna i heterotrofna kultivacija mikroalgi temelj su aktualnih istraživanja zahvaljujući većoj produktivnosti sinteze biomase. U ovom radu proveden je niz eksperimenata s ciljem selekcije najprikladnijeg sastava podloge i uvjeta kultivacije za dobivanje vrijednih proizvoda. Istražen je rast na različitim izvorima ugljika te definiran učinak različitih molarnih omjera C:N na nakupljanje lipida i ugljikohidrata u biomasi uz različite procesne uvjete. Utvrđena je akumulacija rezervnih makromolekula pri višim omjerima C:N. Na temelju saznanja iz prethodno provedenih eksperimenata, proveden je heterotrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* kojim je postignut prinos biomase od 20 g L<sup>-1</sup> uz produktivnost 0,0747 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Tijekom uzgoja praćene su promjene sastava biomase. Troškovi izdvajanja biomase mikroalgi predstavljaju najveću prepreku komercijalizaciji biodizela proizvedenog ovom tehnologijom. Princip bioflokulacije kao alternativne tehnike izdvajanja stanica dokazan je uzgojem mješovite kulture s plijesnima *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina*.

**Ključne riječi:** mikroalge, *Chlorella vulgaris*, omjer C:N, lipidi, bioflokulacija

**Rad sadrži:** 78 stranica, 32 slike, 11 tablica, 106 literaturnih navoda, 5 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

**Pomoć pri izradi:** Marina Grubišić, mag. ing.

#### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. Ksenija Markov
2. Prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek
3. Prof.dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof.dr.sc. Jasna Novak (zamjena)

**Datum obrane:** 12. prosinca 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Biochemical Engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering,  
Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

### OPTIMIZATION OF MIXOTROPHIC AND HETEROTROPHIC MICROALGAL CULTIVATION AND EXAMINATION OF FUNGAL ASSISTED BIOFLOCCULATION EFFICIENCY

*Ines Peremin, 1167/BPI*

#### Abstract:

Mixotrophic and heterotrophic microalgal cultivation are the basis of current research owing to higher biomass productivity. In this paper, a series of experiments was conducted with the aim of selecting the most suitable substrate composition and cultivation conditions to obtain valuable products. Growth on different carbon sources was investigated and the effect of different molar C:N ratios on the accumulation of lipids and carbohydrates in biomass was defined. The accumulation of storage macromolecules at higher C: N ratios was confirmed. Based on the previous findings, heterotrophic fed-batch cultivation of *Chlorella vulgaris* was carried out in bioreactor which yielded of 20 g L<sup>-1</sup> of biomass with a productivity of 0,0747 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Changes in biomass composition were monitored during cultivation. The cost of biomass harvest is the biggest obstacle to the commercialization of microalgal biodiesel. The principle of bioflocculation as an alternative cell harvesting technique has been demonstrated in the mixed culture with fungi *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina*.

**Keywords:** microalgae, *Chlorella vulgaris*, C:N ratio, lipids, bioflocculation

**Thesis contains:** 78 pages, 32 figures, 11 tables, 106 references, 5 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD. Mirela Ivančić Šantek, Full professor

**Technical support and assistance:** Marina Grubišić, MSc.

#### Reviewers:

1. PhD. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Mirela Ivančić Šantek, Full professor
3. PhD. Ivana Radojčić Redovniković, Full professor
4. PhD. Jasna Novak, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 12 December 2019

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	<b>2</b>
2.1. Podrijetlo i klasifikacija mikroalgi	2
2.1.1. Zelene alge	3
2.2. Biotehnološka primjena mikroalgi	3
2.3. Najvažniji metabolički procesi u stanicama mikroalgi	6
2.3.1. Načini ishrane i pridobivanja energije	6
2.3.1.1. Fotosinteza	6
2.3.2. Biosinteza lipida	8
2.4. Kultivacija mikroalgi	9
2.4.1. Načini kultivacije	9
2.4.2. Kultivacijski sustavi	11
2.4.2.1. Otvoreni i zatvoreni sustavi za fotoautotrofnu i miksotrofnu kultivaciju	11
2.4.2.2. Zatvoreni sustavi za heterotrofni uzgoj	14
2.5. Izdvajanje mikroalgi potpomognuto mikroorganizmima	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>17</b>
3.1. Materijali	17
3.1.1. Radni mikroorganizmi	17
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga	17
3.1.3. Ostale kemikalije	19
3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj monokulture mikroalgi	19
3.1.4.1. Hranjiva podloga za ispitivanje i optimiranje rasta na različitim izvorima ugljik	20
3.1.4.2. Hranjiva podloga za optimiranje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika	21
3.1.4.3. Hranjiva podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata u laboratorijskom bioreaktoru	21
3.1.5. Hranjiva podloga za održavanje i uzgoj spora plijesni	21
3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj mješovite kulture mikroalgi i plijesni	22
3.1.7. Oprema i aparatura	22
3.1.7.1. Laboratorijski bioreaktor	22
3.1.7.2. Centrifuge	23
3.1.7.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)	23
3.1.7.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)	23
3.1.7.5. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)	23
3.1.7.6. Ostala oprema i aparatura	24
3.2. Metode	25
3.2.1. Priprema inokuluma	25
3.2.1.1. Uzgoj inokuluma mikroalgi	25
3.2.1.2. Uzgoj spora plijesni	25
3.2.2. Ispitivanje rasta na različitim izvorima ugljika	25
3.2.3. Optimiranje koncentracija odabranih izvora ugljika	26
3.2.4. Optimiranje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika	28
3.2.5. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u laboratorijskom bioreaktoru	28
3.2.6. Uzgoj mješovite kulture mikroalge i plijesni	29
3.2.7. Mikrobiološke i analitičke metode	30
3.2.7.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici	30
3.2.7.2. Mjerenje optičke gustoće kulture	30
3.2.7.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase	30
3.2.7.4. Određivanje koncentracije glukoze u podlozi	31
3.2.7.5. Identifikacija staničnih makromolekula primjenom FT-IR	31
3.2.7.6. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi	31
3.2.7.7. Određivanje ukupnih lipida u biomasi mikroalgi	32
3.2.7.8. Određivanje koncentracije i profila masnih kiselina u biomasi mikroalgi	33
3.2.7.9. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila a i b	34
3.2.7.10. Određivanje udjela proteina u biomasi mikroalgi	35
3.2.7.11. Određivanje sadržaja pepela u biomasi mikroalgi	36
3.2.7.12. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocasa	36



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>38</b>
4.1. Rast na različitim izvorima ugljika .....	39
4.2. Rast pri različitim koncentracijama izvora ugljika .....	42
4.3. Rast pri različitim koncentracijama izvora dušika.....	44
4.3.1. Učinak različitih C:N omjera na rast i nakupljanje rezervnih makromolekula .....	44
4.3.2. Miksotrofni uzgoj pri različitim C:N omjerima .....	47
4.4. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata .....	52
4.4.1. Sastav biomase .....	54
4.4.1.1. Ugljikohidrati .....	55
4.4.1.2. Lipidi .....	56
4.4.1.3. Proteini .....	59
4.4.1.4. Pigmenti .....	60
4.5. Uzgoj mješovite kulture .....	63
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>68</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>69</b>
<b>7. PRILOZI</b>	

## 1. UVOD

Mikroalge su postale važno industrijsko uporište zahvaljujući njihovom doprinosu brojnim sektorima biotehnoške proizvodnje. Iako se temeljni interes za biotehnoškim iskorištavanjem mikroalgi razvijao u sektoru biogoriva, s vremenom je došlo do porasta njihovog značaja u sektoru prirodnih proizvoda (Sexton i Lomas, 2018). Mikroalge posjeduju brojne morfološke, fiziološke i genetičke značajke koje omogućuju proizvodnju različitih biološki aktivnih metabolita. S druge strane, od svih vrsta goriva proizvedenih iz mikroalgi, najviše pažnje je usmjereno prema biodizelu zahvaljujući kemijskim karakteristikama sličnim naftnom dizel gorivu te mogućnosti direktnog uvođenja u transportnu infrastrukturu s neznatnim preinakama na postojećoj tehnologiji (Fang, 2019). Međutim, s obzirom na trenutnu ekonomsku nepraktičnost, koncept proizvodnje biodizela pomoću mikroalgi daleko je od komercijalne ostvarivosti. Posebice se energetske zahtjevnim dijelom procesa navodi izdvajanje stanica iz podloge te ovaj korak zahtijeva znatna poboljšanja u svrhu postizanja isplativosti proizvodnje. Osim toga, napor se ulaže u istraživanje uvjeta kultivacije pri kojima se ostvaruje željeni sastav biomase. Vrlo je interesantna primjena miksotrofne i heterotrofne kultivacije koje podrazumijevaju rast mikroalgi na organskom izvoru ugljika. Ovi načini uzgoja nude brojne tehnološke prednosti pred konvencionalnom fotoautotrofnom kultivacijom, naročito u smislu više produktivnosti sinteze biomase koja rezultira visokom produktivnošću sinteze lipida. S obzirom na troškove konvencionalnih tehnika izdvajanja mikroalgi, posljednjih se godina kao alternativna tehnika ističe bioflokulacija. Poseban interes usmjeren je prema uzgoju mješovitih kultura mikroalgi i filamentoznih plijesni zahvaljujući njihovoj prirodnoj sposobnosti formiranja peleta koji se iz podloge mogu izdvojiti jednostavnom filtracijom.

Ciljevi ovog rada obuhvaćali su istraživanje miksotrofnog i heterotrofnog rasta slatkovodnih mikroalgi pri različitim uvjetima kultivacije primjenom sekvencionalnog povećanja volumena kulture. Pritom se nastojalo odabrati najpogodniji soj i izvor ugljika za proizvodnju najznačajnijih metabolita. Nadalje, nastojalo se optimirati molarne omjere ugljika i dušika u podlozi te usporediti njihov utjecaj na sastav biomase odabrane mikroalge te primijeniti stečena saznanja na uzgoj u bioreaktorskom sustavu. S obzirom na navedenu problematiku izdvajanja stanica, jedan od ciljeva rada odnosio se i na istraživanje učinkovitosti bioflokulacije primjenom različitih sojeva plijesni.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PODRIJETLO I KLASIFIKACIJA MIKROALGI

Alge su jedan od najstarijih oblika života na Zemlji. Ova skupina uključuje različite mikro- i makroskopske organizme polifiletskog podrijetla zbog čega se smatra genetski najraznovrsnijom u biosferi. Tradicionalna karakterizacija mikroalgi temeljena je na fenotipskim obilježjima, primjerice morfologiji čitavog organizma, staničnoj anatomiji i ultrastrukturi te su kategorizirane sukladno principima Međunarodnog kodeksa botaničke nomenklature<sup>1</sup> (Eriksen, 2012). Razgraničavanje pojedinih vrsta mikroalgi pokazalo se izrazito zahtjevnim i podložnim utjecaju dostupne tehnologije i metodologije (Malavasi i sur., 2016). Devedesetih godina prošlog stoljeća u sistematiku i taksonomiju mikroalgi uveden je tzv. molekularni koncept koji podrazumijeva filogenetsku analizu molekularnih markera (različite sekvence ribosomalne DNA, aktin, neki od kloroplastnih i mitohondrijskih gena; Pröschold i Leliaert, 2007). Molekularna razmatranja pokazala su se poprilično oprečnima prvobitnom morfološkom konceptu i ukazala na snažnu potrebu za preinakama prethodno uspostavljene klasifikacije mikroalgi. Podatci o aktualnom nazivlju poznatih vrsta dostupni su u taksonomskoj bazi podataka *AlgaeBase* (Borowitzka, 2016).

Budući da alge nisu monofiletskog podrijetla, trenutno su svrstane u četiri carstva: Bacteria, Plantae, Chromista i Protozoa (Borowitzka, 2016). Ovisno o interpretaciji, mikroalge je moguće razvrstati u 2 prokariotska (Metting, 1996; Pulz i Gross, 2004) te 7 (Andersen, 1992) ili više (Heimann i Huerlimann, 2015; Sexton i Lomas, 2018) eukariotskih koljena. Ipak, filogenetski odnosi između pojedinih skupina još se uvijek utvrđuju te stoga gruba podjela uključuje 11 koljena: Cyanophyta (cijanobakterije), Chlorophyta (zelene alge), Rhodophyta (crvene alge), Glaucophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Charophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Heterokontophyta i Dinoflagellata (Barkia i sur., 2019). Analiza fosilnih ostataka upućuje na nastanak prokariotskog koljena Cyanophyta u razdoblju ranog Prekambrija, dok se prva pojava eukariotskih algi veže uz srednji do kasni Prekambrij (Marques i sur., 2012). Smatra se da je endosimbioza cijanobakterije s heterotrofnim eukariotskim domaćinom rezultirala simultanom pojavom koljena Chlorophyta, Rodophyta i Glaucophyta. Za navedena koljena karakteristično je posjedovanje primarnih plastida s dvostrukom membranom što ih razlikuje od ostalih eukariotskih mikroalgi čiji su plastidi okruženi s više od dvije membrane (Sexton i Lomas, 2018). Očigledno je da se nastanak ostalih skupina mikroalgi veže uz tzv.

---

<sup>1</sup> od 2011. poznat pod nazivom Međunarodni kodeks nomenklature algi, gljiva i biljaka

sekundarnu endosimbiozu, odnosno transformaciju crvene ili zelene alge u plastid unutar eukariotskog domaćina (Pulz i Gross, 2004).

### 2.1.1. Zelene alge

Koljeno Chlorophyta predstavlja jednu od najznačajnijih skupina eukariotskih mikroalgi s obzirom na brojnost vrsta, rasprostranjenost i morfološku raznolikost. Zelene alge nastanjuju slatkovodna, morska i kopnena staništa (Heimann i Huerlimann, 2015). Plastidi ovih organizama sadrže klorofile *a* i *b*. Stanične stijenke su građene od celuloze, a rezervni polisaharid u stanicama je obično škrob. Poput ostalih fotosintetskih eukariota, zelene alge unutar kloroplasta sadrže pirenoide koji su uključeni u fotosintetsku fiksaciju ugljika te sintezu i pohranu škroba (Rajkumar i Yaakob, 2013). Od devet razreda koljena Chlorophyta, osam uključuje mikroalge (Sexton i Lomas, 2018). Razredima *Chlorophyceae* i *Trebouxiophyceae* pripadaju biotehnološki najznačajniji rodovi, primjerice *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Chlorella* i *Nannochloris*. Ovi razredi zelenih mikroalgi ujedno dominiraju i brojnošću; zajedno broje preko 3000 vrsta (Pulz i Gross, 2004).

## 2.2. BIOTEHNOLOŠKA PRIMJENA MIKROALGI

Mikroalge predstavljaju jedinstvenu skupinu mikroorganizama koja je u stanju zadovoljiti gotovo sve potrebe moderne biotehnologije. Cijanobakterije proizvode više od 200 bioaktivnih metabolita, dok se u eukariotskih mikroalgi njihova količina procjenjuje na tisuće (Barkia i sur., 2019). Golema fiziološka raznolikost mikroalgi omogućuje dobivanje različitih proizvoda u području bioenergetike, finih kemikalija, farmaceutike te u najvećoj mjeri prehrambene industrije. Uz navedene proizvode mikroalge su neizostavan faktor u održavanju ravnoteže u ekosustavima zahvaljujući sposobnosti uklanjanja kontaminanata i oplemenjivanja tla te fiksacije CO<sub>2</sub> iz atmosfere (Pulz i Gross, 2004; Koller i sur., 2014). Neki od značajnih proizvoda mikroalgi prikazani su u tablici 1. Valja naglasiti da cijena proizvoda izoliranih iz biomase uvelike ovisi o njihovom udjelu, zahtjevnosti ekstrakcije i potrebnom stupnju čistoće.

Lipidi su jedna od udjelom najzastupljenijih komponenata biomase mikroalgi (Perez-Garcia i Bashan, 2015). Fokus suvremenih istraživanja upravo je povećanje prinosa lipida manipulacijom uvjeta uzgoja ili genetičkim inženjerstvom s ciljem postizanja veće produktivnosti proizvodnje (Enamala i sur., 2018). Uz lipide kao vodeću sirovinu za proizvodnju biogoriva, mali broj vrsta mikroalgi može proizvesti i biovodik koji je pogodan za upotrebu u motorima s unutarnjim izgaranjem te mlaznim turbinama (Fang, 2019).

**Tablica 1.** Neki od proizvoda mikroalgi i njihova tržišna vrijednost (prema Koller i sur, 2014).

proizvod	približna tržišna vrijednost [\$ kg <sup>-1</sup> ]
biomasa za ljudsku prehranu	40 - 50
biomasa za ishranu životinja	10
nutraceutici	120
biodizel	3-4*
β-karoten	300-3000
astaksantin	> 2000
fikobiliproteini	3000 - 25000
β-1,3-glukan	5 - 20
DHA	50
EPA	4600 <sup>#</sup>

*DHA* dokosaheksaenoična kiselina, *EPA* eikosapentaenoična kiselina, \*općenita tržišna cijena biodizela iznosi 0,5 \$ kg<sup>-1</sup>, <sup>#</sup> tržišna cijena za proizvod visoke čistoće

Izuzev upotrebe za proizvodnju biodizela, lipidi mikroalgi predstavljaju vrijedan izvor fitosterola i višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Značaj fitosterola izoliranih iz mikroalgi ubrzano raste, zahvaljujući pozitivnom učinku u terapiji karcinoma, infekcija i neuroloških bolesti (Khan i sur., 2018). Višestruko nezasićene masne kiseline zauzimaju značajno mjesto na tržištu visokovrijednih proizvoda kao kvalitetna zamjena za riblje ulje budući da obuhvaćaju ω-3 i ω-6 masne kiseline koje su esencijalne za normalno funkcioniranje ljudskog organizma (Barkia i sur., 2019). Zahvaljujući njihovim raznovrsnim fiziološkim ulogama, važna su komponenta funkcionalne hrane (Koller i sur., 2014).

Pigmenti su jedan od financijski najvrjednijih proizvoda mikroalgi, međutim faktori poput malih prinosa te otežane i skupe izolacije predstavljaju svojevrsnu prepreku proizvodnji velikih razmjera. U zelenih algi najzastupljeniji pigment je klorofil koji se ponajviše upotrebljava u prehrambenoj industriji kao bojilo. Nadalje, u terapijske svrhe koristi se klorofilin (derivat klorofila) kao inhibitor karcinogeneze (Koller i sur, 2014). Uz klorofile, kao sekundarni ali i dalje vrlo važni pigmenti spominju se karotenoidi koji zahvaljujući antioksidativnim svojstvima svoju primjenu nalaze u ljudskoj prehrani i kozmetičkoj industriji. Fikobilini podrijetlom iz cijanobakterija i crvenih algi često se koriste za istraživanja imunofluorescencijskim tehnikama u formi fikobiliproteina. Pored ove sofisticirane upotrebe, važan su sastojak prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (Bleakley i Hayes, 2017).

Iako mikroalge predstavljaju koristan izvor ugljikohidrata, primjena ekstrakta u formi dodataka prehrani je ograničena. Međutim, njihova važnost raste u kozmetičkoj industriji gdje se pretežno primjenjuju kao higroskopna sredstva i antioksidansi (Barkia i sur., 2019). U području bioenergetike razmatra se primjena hidrolizata polisaharidima bogatih mikroalgi za proizvodnju bioetanola (Veillette i sur., 2017). Proteini mikroalgi također predstavljaju važan proizvod, budući da njihov udio u biomasi pojedinih sojeva doseže i do 70 % (Barkia i sur., 2019). Mikroalge sadrže sve esencijalne aminokiseline neophodne za ishranu sisavaca, što ih čini prikladnim dodatkom prehrani. Tijekom prošlog desetljeća, stanice mikroalgi intenzivno su istraživane u svrhu njihove primjene kao ekspresijskog sustava za proizvodnju rekombinantnih proteina. Upotrebom metoda genetičkog inženjerstva uspješno su eksprimirani terapijski proteini u kloroplastima zelenih algi (Dixon i Wilken, 2018). Osim protutijela, enzima i hormona, predmet aktualnih istraživanja je ekspresija virusnih i bakterijskih antigena u svrhu proizvodnje 'jestivih vakcina' za animalnu upotrebu (Dyo i Purton, 2018).

Kombinacija obrade otpadne vode i proizvodnje biogoriva pomoću mikroalgi smatra se najperspektivnijim sustavom u vidu industrijske primjene (Brennan i Owende, 2010). Pročišćavanje otpadne vode pomoću mikroalgi privuklo je globalnu pažnju, zahvaljujući visokoj efikasnosti uklanjanja nitrata i fosfata, uz smanjenje KPK-vrijednosti tijekom heterotrofnih perioda kultivacije (Gonçalves i sur., 2016). Još jedna ekološki i ekonomski zanimljiva primjena mikroalgi koja bi mogla zaživjeti u budućnosti podrazumijeva sekvestraciju CO<sub>2</sub> podrijetlom iz industrijskih dimnih plinova (Cheah i sur., 2014). Posljednjih godina sve se više istražuje mogućnost upotrebe mikroalgi u modernoj poljoprivredi (Ronga i sur., 2019). Promatranje fizioloških funkcija mikroalgi potaknulo je njihovu primjenu za bioremedijaciju i povećanje plodnosti tla. Mnoge zelene mikroalge i cijanobakterije stimuliraju rast biljaka proizvodnjom hormona rasta poput auksina, citokinina i jasmoninske kiseline, a istraživanja su ujedno ukazala na važnu ulogu u modulaciji obrambenih mehanizama biljaka (Renuka i sur., 2018). Na posljetku, mikroalge nude rješenje još jedne aktualne problematike. Upotreba bioplina kao goriva zahtijeva proizvod visoke čistoće, budući da je njegova ogrjevna vrijednost definirana udjelom metana. Pročišćavanje bioplina podrazumijeva smanjenje udjela ugljikovog dioksida (Ramaraj i Dussadee, 2015). Zahvaljujući visokoj fotosintetskoj aktivnosti, mikroalge predstavljaju alternativu kojom je moguće prevladati nedostatke konvencionalnih tehnika pročišćavanja bioplina. Također, u porastu je interes za integracijom procesa anaerobne digestije s konceptom biorafinerije u svrhu obrade otpadne biomase mikroalgi nakon izolacije vrijednih proizvoda (Uggetti i sur., 2016).

## 2.3. NAJVAŽNIJI METABOLIČKI PROCESI U STANICAMA MIKROALGI

### 2.3.1. Načini ishrane i pridobivanja energije

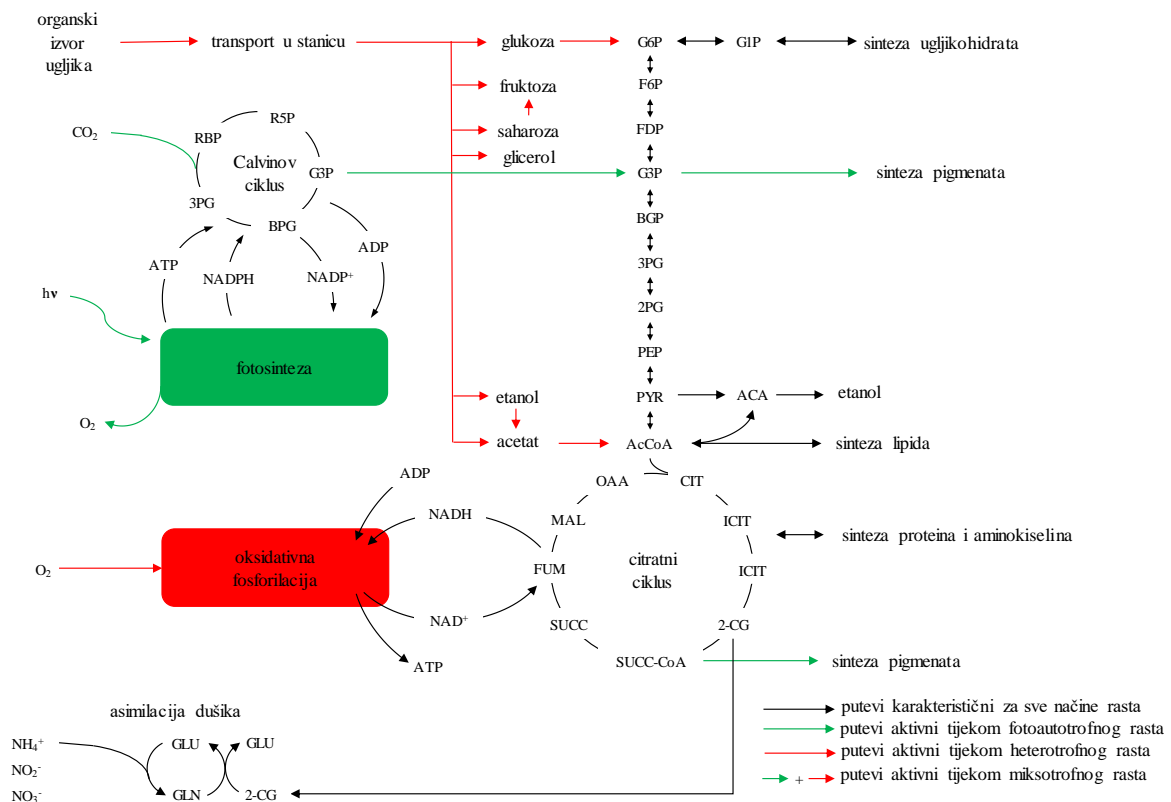
Općenito, mikroalge se smatraju fotoautotrofnim organizmima pri čemu energija koju koriste za rast i održavanje potječe iz fotosinteze. Međutim, pojedine vrste izolirane na područjima limitiranog solarnog zračenja sposobne su heterotrofno iskorištavati širok spektar organskih izvora ugljika, koji stanicama ujedno služe i kao izvori energije (Morales-Sánchez i sur., 2014). Fotoheterotrofni rast svojstven je malom broju vrsta. Ove vrste zahtijevaju opskrbu svjetlošću koja služi kao izvor energije prilikom korištenja organskih spojeva kao izvora ugljika (Chen i sur., 2011). Za miksotrofni način ishrane karakteristična je simultana potrošnja CO<sub>2</sub> i organskog izvora ugljika u prisustvu svjetlosti. U usporedbi s fotoheterotrofnim rastom, energija potrebna za obavljanje staničnih funkcija pridobiva se fotosintezom, ali i putem asimilacije organskih spojeva iz okoline stanice. S obzirom na ovu činjenicu, solarna energija ne predstavlja limitirajući faktor za rast miksotrofnih vrsta (Mohan i sur., 2014).

Kao i u mnogih drugih mikroorganizama, glukoza je preferirani izvor ugljika za rast miksotrofnih i heterotrofnih vrsta mikroalgi. Od nekoliko poznatih biokemijskih puteva razgradnje glukoze, za mikroage su karakteristična samo dva: Embden-Meyerhof-Parnasov i pentoza-fosfatni put (Perez-Garcia i Bashan, 2015). Prvi je dominantan kod miksotrofnog rasta u prisustvu svjetlosti, dok se u tami glukoza metabolizira uglavnom pentoza-fosfatnim putem (Slika 1). Većina enzima pentoza-fosfatnog puta aktivna je i u Calvinovom ciklusu, što upućuje na potencijalnu zajedničku regulaciju metabolizma izvora ugljika i fotosintetske fiksacije CO<sub>2</sub> (Morales-Sánchez i sur., 2014). Mnoge vrste mikroalgi sposobne su metabolizirati acetat putem glioksilatnog ciklusa u glioksisomima (Combres i sur., 1994). Međutim, visoke koncentracije octene kiseline inhibiraju rast. Glicerol je još jedan od značajnijih supstrata koji podržavaju rast mikroalgi u heterotrofnim uvjetima. U stanicu se transportira jednostavnom difuzijom, gdje se fosforilira i oksidira do gliceraldehid-3-fosfata koji je jedan od intermedijera Embden-Meyerhof-Parnasovog puta (Chen i Jiang, 2017).

#### 2.3.1.1. Fotosinteza

Fotosinteza je jedan od temeljnih biokemijskih puteva u kojem se odvija pretvorba energije svjetlosti u biokemijsku energiju potrebnu za rast i funkcioniranje stanice. Ovaj proces tradicionalno podrazumijeva tzv. reakcije na svjetlu i reakcije u tami. U eukariotskih mikroalgi i viših biljaka reakcije na svjetlu odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta, dok se kod prokariotskih cijanobakterija taj sustav nalazi na membrani same stanice (Golbeck, 1994).

Kompleks koji omogućuje transport elektrona i fotofosforilaciju sastoji se od fotosustava II, fotosustava I, citokroma  $b_6/f$  i ATP sintaze (Masojđek i sur., 2013). Fotosintetski ciklus započinje apsorpcijom fotona u molekulama pigmenata fotosustava II, što rezultira ekscitacijom elektrona i njihovim sekvencionalnim prijenosom do fotosustava I. Posrednik u prijenosu elektrona je proteinski kompleks citokroma  $b_6/f$  zajedno s mobilnim akceptorima plastokinonom i plastocijaninom. Prilikom oksidacije fotosustava II, ekscitirani se elektroni nadomještaju fotolizom vode, čija je posljedica oslobađanje elementarnog kisika. Pri prijenosu elektrona kroz fotosustav II dolazi do formiranja transmembranskog gradijenta protona koji predstavlja pokretačku silu za sintezu ATP-a.



**Slika 1.** Usporedba metaboličkih puteva asimilacije izvora ugljika karakterističnih za pojedini način rasta (prema Perez-Garcia i Bashan, 2015). *2-OG*  $\alpha$ -ketoglutarat, *2PG* 2-fosfoglicerat, *3PG* 3-fosfoglicerat, *ACA* acetaldehid, *R5P* ribuloza-5-fosfat, *AcCoA* acetil koenzim A, *BPG* 1,3-bisfosfoglicerat, *G1P* glukoza-1-fosfat, *CIT* citrat, *F6P* fruktoza-6-fosfat, *FDP* fruktoza-1,6-bisfosfat, *FUM* fumarat, *G3P* gliceraldehid-3-fosfat, *G6P* glukoza-6-fosfat, *GLN* glutamin, *GLU* glutamat, *ICIT* izocitrat, *MAL* malat, *OAA* oksaloacetat, *OXA* oksalosukcinat, *PEP* fosfoenolpiruvat, *PYR* piruvat, *RBP* ribuloza-1,5-bisfosfat, *SUCC* sukcinat, *SUCCCoA* sukcinil koenzim A.



Apsorpcija fotona u fotosustavu I inducira prijenos elektrona preko feredoksina do krajnjeg akceptora elektrona,  $\text{NADP}^+$  (Bishop, 1971). Osnovna svrha reakcija na svjetlu je opskrba stanice energijom i biokemijskim reducensima nužnim za odvijanje reakcija u tami (Calvinov ciklus) koje omogućuju asimilaciju ugljikovog dioksida (Slika 1).

### 2.3.2. Biosinteza lipida

Oleaginozne mikroalge tijekom kultivacije u povoljnim uvjetima sintetiziraju manje količine neutralnih lipida, pretežito u formi triacilglicerola. Međutim, stresni uvjeti, primjerice limitacija nutrijentima, povišena temperatura, visok intenzitet svjetlosti i salinitet induciraju pojačanu akumulaciju lipida koji se unutar stanice pohranjuju u lipidnim globulama. U uvjetima osmotskog stresa, glicerol djeluje poput osmolita u svrhu održavanja ravnoteže soli unutar stanice. Korelacija između proizvodnje glicerola i razgradnje škroba u stanicama zelenih mikroalgi upućuje da se škrob koristi kao izvor energije, a potencijalno i kao izvor ugljika za sintezu glicerola (Skjånes i sur., 2013). Pojačana akumulacija lipida u stanicama mikroalgi najčešće je promatrana u uvjetima limitacije izvorom dušika. Također, istražena je stimulacija ovog fenomena iscrpljivanjem drugih nutrijenata, primjerice silicija kod dijatomeje *Cyclotella cryptica*, sumpora kod zelenih mikroalgi *Chlorella ellipsoidea* i *Chlamydomonas reinhardtii*, fosfora kod morske dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* i slatkovodne mikroalge *Monodus subterraneus* te cinka i željeza kod *Chlamydomonas reinhardtii* (Zienkiewicz i sur., 2016). Smatra se da je prekomjerno nakupljanje triacilglicerola tijekom limitacije izvorom dušika efikasan način zaštite stanice od fotooksidativnog oštećenja uzrokovanog štetnim nakupljanjem fotoasimilata (Khozin-Goldberg, 2016). Naime, u nepovoljnim uvjetima prijeti opasnost od porasta razine reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) uslijed nakupljanja elektrona u fotosintetskom elektron transportnom lancu, koje značajno inhibiraju fotosintezu i uzrokuju oštećenja staničnih makromolekula. Rasterećenje prekomjerno reduciranog lanca elektrona omogućeno je preusmjeravanjem toka elektrona prema nastajanju NADPH koji predstavlja reduktivnu snagu u biosintezi masnih kiselina.

Akumulacija energijom bogatih spojeva preduvjet je za biosintezu lipida u stanicama mikroalgi. Ovisno o načinu ishrane, ovi se spojevi pribavljaju fotosintezom, odnosno asimilacijom iz okoline stanice. Ishodišni spoj za sintezu lipida je acetil-CoA. Analogno principu u viših biljaka, *de novo* biosinteza masnih kiselina odvija se u plastidima mikroalgi (Khozin-Goldberg, 2016). Inicijalni i ključni korak regulacije u biosintezi masnih kiselina predstavlja konverzija acetil-CoA u malonil-CoA u ATP-zavisnoj reakciji koju katalizira acetil-

CoA karboksilaza. Reakcija se odvija u dva koraka: biotin karboksilaza (podjedinica CoA karboksilaze) katalizira parcijalnu reakciju karboksilacije biotinskog kofaktora pomoću bikarbonata. Podjedinica karboksiltransferaza katalizira prijenos karboksilne grupe na acetil-CoA pri čemu nastaje malonil-CoA. Sinteza masnih kiselina započinje prijenosom malonilne jedinice na proteinski nosač acila (eng. *acyl carrier protein*) koji je nekatalitička komponenta multienzimskog kompleksa sintaze masnih kiselina. Elongacija acilnog lanca podrazumijeva odvijanje ponavljajućeg ciklusa od četiri reakcije: kondenzacija, redukcija, dehidratacija i redukcija pri čemu se rastući acilni lanac produljuje za 2 C-atoma u svakom ciklusu. Najčešće se odvija sedam ciklusa elongacije te nastaje primarni produkt palmitinska kiselina (16:0) koja je prekursor za biosintezu ostalih dugolančanih masnih kiselina (Mohan i sur., 2014). Mehanizam elongacije odvija se identično sintezi palmitata; postojeći lanac se produljuje za 2 C-atoma i nastaje stearinska kiselina (18:0) koja predstavlja svojevrsno raskrižje u sintezi masnih kiselina. Daljnja elongacija stearata rezultira formiranjem duljih zasićenih masnih kiselina, dok se desaturacijom dobiva oleinska kiselina (18:1,  $\omega$ -9). Višestruka desaturacija oleinske kiseline dovodi do formiranja  $\alpha$ - (18:3,  $\omega$ -3) i  $\gamma$ -linolenske kiseline (18:3,  $\omega$ -6). Konverzijom  $\alpha$ -linoleata nastaju ostale višestruko nezasićene masne kiseline, dok elongacija i desaturacija  $\gamma$ -linoleata rezultira formiranjem arahidonske kiseline (20:4,  $\omega$ -6).

Predloženo je nekoliko puteva biosinteze triacilglicerola u stanicama mikroalgi (Zienkiewicz i sur., 2016). Enzimi konvencionalnog glicerol fosfatnog puta, poznatog kao Kennedyev put, lokalizirani su u endoplazmatskom retikulumu. Kennedyev put podrazumijeva sekvencionalni prijenos acilnog lanca s CoA na pozicije 1 i 2 glicerol-3-fosfata što rezultira formiranjem fosfatidne kiseline - centralnog lipidnog metabolita koji je prekursor za sintezu triacilglicerola i fosfolipida (Hu i sur., 2018). Sljedeći korak je defosforilacija fosfatidne kiseline koju katalizira specifična fosfataza, a produkt ove reakcije je diacilglicerol. Završni prijenos masne kiseline na poziciju 3 diacilglicerola kataliziran diacilglicerol aciltransferazom.

## 2.4. KULTIVACIJA MIKROALGI

### 2.4.1. Načini kultivacije

Odabir načina kultivacije mikroalgi od presudnog je značaja za postizanje maksimalne produktivnosti i procjenu isplativosti procesa proizvodnje. Ovisno o prethodno opisanim izvorima ugljika i energije koje stanice koriste za rast, zastupljena su četiri načina kultivacije: fotoautotrofni, heterotrofni, fotoheterotrofni i miksotrofni (Perez-Garcia i Bashan, 2015).

Najčešće se provodi fotoautotrofna kultivacija koja podrazumijeva korištenje anorganskog izvora ugljika (CO<sub>2</sub>) i svjetlosti kao izvora energije. Mikroalge za koje je utvrđeno da mogu rasti miksotrofno i heterotrofno uključuju *Haematococcus pluvialis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas globosa*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus bijuja*, *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus* sp. te mnoge vrste iz roda *Chlorella* (Ogbonna i Moheimani, 2015). Budući da je izvor energije za fotoheterotrofni rast isključivo svjetlost, ovaj način kultivacije rijetko se koristi za proizvodnju biomase mikroalgi u svrhu dobivanja vrijednih proizvoda (Wang i sur, 2014).

U usporedbi s fotoautotrofnim rastom, heterotrofnom i miksotrofnom kultivacijom postižu se znatno veći prinosi biomase i vrijednih proizvoda mikroalgi. Eksponencijalno smanjenje penetracije svjetlosti s porastom turbiditeta uslijed fotoautotrofne kultivacije uzrok je poteškoća u postizanju visoke koncentracije biomase, kao i produktivnosti samog procesa (Wang i sur, 2014). Tehnološke značajke različitih načina kultivacije mikroalgi sumirane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Usporedba tehnoloških značajki različitih načina kultivacije (modificirano prema Perez-Garcia i Bashan, 2015).

tehnološka značajka/ način kultivacije	fotoautotrofno	heterotrofno	miksotrofno
izvor energije	svjetlost	organski	svjetlost i organski
izvor ugljika	anorganski	organski	anorganski i organski
produktivnost proizvodnje biomase	niska	srednja	visoka
izvor svjetlosti	obavezan	nije potreban	neobavezan
limitirajući faktor rasta	svjetlost	kisik	svjetlost ili kisik
emisija CO <sub>2</sub>	negativna	pozitivna	neutralna, CO <sub>2</sub> se proizvodi i troši
tip bioreaktora	fotobioreaktor, otvoreni sustavi	konvencionalni bioreaktori	fotobioreaktor, otvoreni sustavi

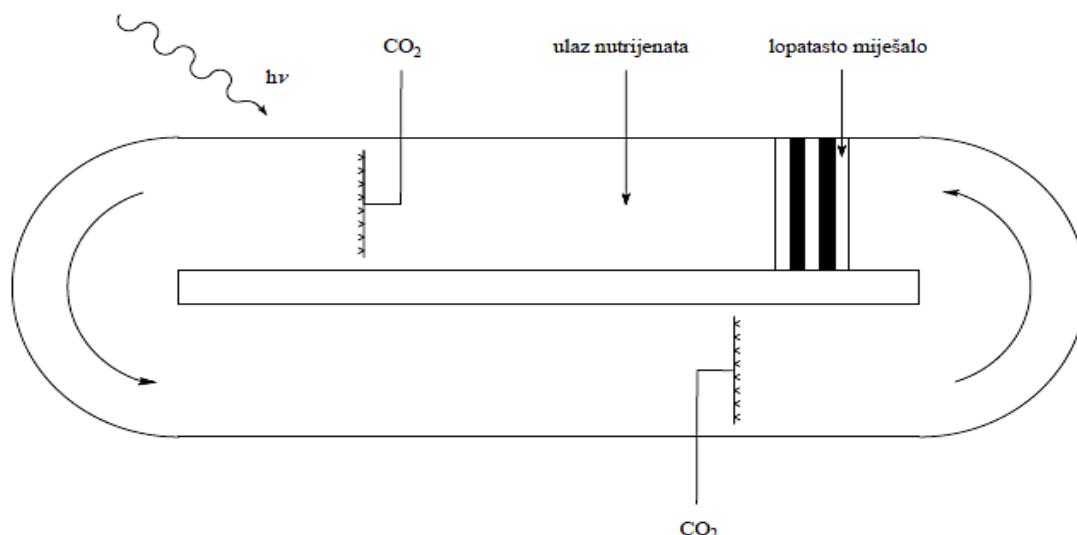
**Tablica 2.** Usporedba tehnoloških značajki različitih načina kultivacije (nastavak).

tehnološka značajka/ način kultivacije	fotoautotrofno	heterotrofno	miksotrofno
omjer površine i volumena bioreaktora ( $\text{m}^2 \text{ m}^{-3}$ )	visok	nizak	visok
kontrola procesa	niska za otvorene sustave	visoka	niska za otvorene sustave
rizik od kontaminacije	nizak	visok	srednji
zahtjevnost izdvajanja	visoka zbog niske koncentracije biomase	niska zbog visoke koncentracije biomase	niska zbog visoke koncentracije biomase
kapitalni troškovi	visoki po jedinici volumena	niski po jedinici volumena	visoki po jedinici volumena
operativni troškovi	niski po kg biomase	srednji po kg biomase	visoki po kg biomase

#### 2.4.2. Kultivacijski sustavi

##### 2.4.2.1. Otvoreni i zatvoreni sustavi za fotoautotrofnu i miksotrofnu kultivaciju

Otvoreni sustavi za fotoautotrofnu kultivaciju mikroalgi najčešće podrazumijevaju umjetne bazene i kanale. Za kultivaciju velikih razmjera obično se upotrebljavaju bazeni s recirkulacijom podloge (eng. *raceway pond*). U ovakvim se sustavima podloga pokreće pomoću lopatastog miješala s ciljem sprječavanja sedimentacije biomase mikroalgi.  $\text{CO}_2$  se u podlogu uvodi raspršivanjem pomoću sustava mlaznica instaliranog na dnu bazena. Za uspješnu opskrbu stanica svjetlošću nužno je da visina podloge u bazenu ne prelazi 0,3 m (Veillette i sur., 2017). Bazen s recirkulacijom podloge jednostavne izvedbe prikazan je na slici 2. Sustav se može dodatno opremiti pregradama koje služe za usmjeravanje toka podloge i olakšavanje miješanja (Chisti, 2007). Otvoreni sustavi pogodni su i za miksotrofnu kultivaciju mikroalgi u slučaju njihove primjene za obradu otpadne vode (Craggs i sur., 2014).



**Slika 2.** Otvoreni bazen s recirkulacijom podloge (modificirano prema Griffiths, 2013).

Mikroalge koje se uspješno uzgajaju u otvorenim bazenima pripadaju rodovima *Spirulina*, *Chlorella* i *Dunaliella* (Vieira-Costa i Greque de Moraes, 2013). Relativno niski operativni troškovi primarni su razlog kultivacije u otvorenim sustavima (Moheimani i sur., 2015). Međutim, u ovakvim sustavima rizik od kontaminacije drugim mikroorganizmima ili stranim vrstama mikroalgi iznimno je visok. Direktna izloženost ultraljubičastom zračenju, nejednolika raspodjela solarne energije, loši hidrodinamički uvjeti i ovisnost intenziteta svjetlosti o meteorološkim prilikama neki su od najznačajnijih faktora koji utječu na stabilnost bioprocasa (Yen i sur., 2013). Smatra se da je teoretska produktivnost otvorenih sustava  $60 \text{ g m}^{-2} \text{ dan}^{-1}$ , međutim u praksi je vrlo teško postići čak i vrijednosti od  $10 - 20 \text{ g m}^{-2} \text{ dan}^{-1}$  (Christenson i Sims, 2011).

Otvoreni sustavi i dalje su prvi izbor za kultivaciju velikih razmjera. Međutim, u svrhu proizvodnje visokovrijednih proizvoda za upotrebu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji javila se potreba za dizajniranjem dobro kontroliranih zatvorenih sustava, tzv. fotobioreaktora (Brennan i Owende, 2010). Zatvorene sustave karakterizira znatno veća fleksibilnost, budući da je moguća optimizacija u skladu s biološkim i fiziološkim potrebama kultiviranog soja (Lam i Lee, 2013). Unatoč višim konstrukcijskim i operativnim troškovima, u ovim sustavima postiže se znatno veća produktivnost proizvodnje biomase mikroalgi. S obzirom na smanjenje rizika od kontaminacije i mogućnost kontrole procesnih parametara, fotobioreaktori omogućuju kultivaciju osjetljivih sojeva uz potencijalno proširenje spektra proizvoda (Griffiths, 2013).

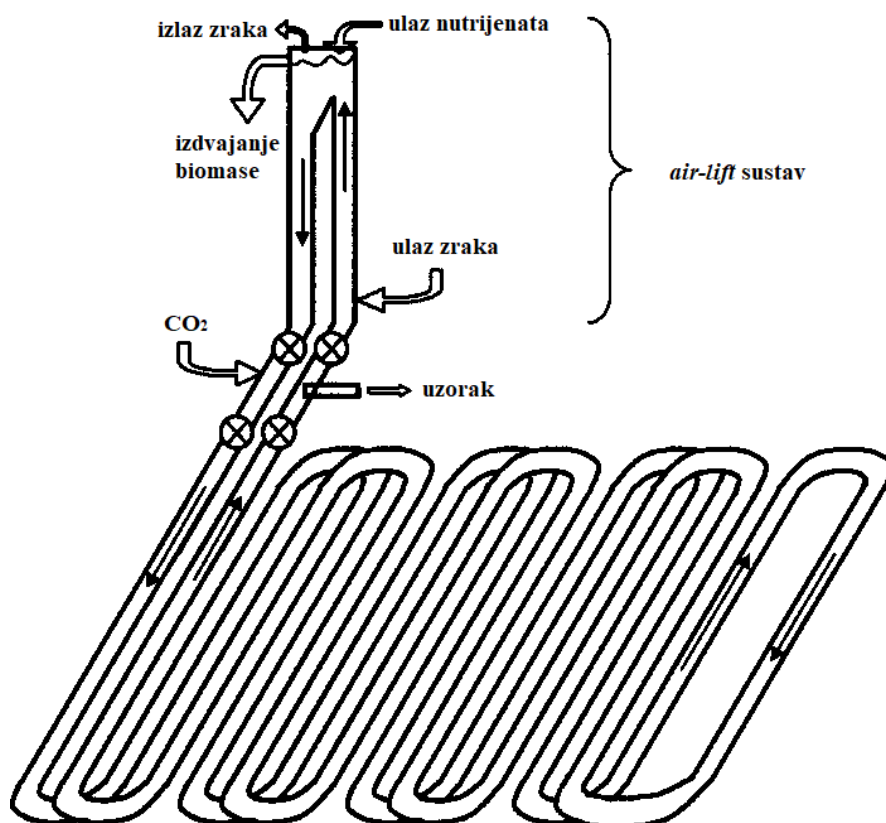
Razvijeno je nekoliko različitih tipova fotobioreaktora uključujući vertikalne kolone, pločaste fotobioreaktore i cijevne fotobioreaktore.

Vertikalne kolone izrađuju se od transparentnog materijala (staklo ili akril) koji olakšava dopremu svjetlosti u kulturu mikroalgi. Raspršivanjem zraka na dnu kolone ostvaruje se miješanje podloge uz efikasan prijenos mase CO<sub>2</sub> (Mohan i sur., 2014). Poželjno je postići turbulentno strujanje podloge u svrhu izbjegavanja inhibicije proizvedenim kisikom. Međutim, ovisno o kultiviranom soju, potrebno je uzeti u obzir mogućnost oštećenja stanica uslijed hidrodinamičkog stresa (Vieira-Costa i Greque de Morais, 2013). Izvor svjetlosti obično je smješten izvan kolone, no razvijaju se i modeli s unutarnjim osvjetljenjem zahvaljujući većoj efikasnosti prodiranja svjetlosti i njenoj uniformnijoj raspodjeli. Ovisno o načinu strujanja tekućine unutar kolone, dijele se na barbotirajuće kolone i *air-lift* fotobioreaktore (Yen i sur., 2013).

Izvedba pločastih fotobioreaktora vrlo je jednostavna. Sastoje se od vertikalnih panela osvijetljenih s obje strane, u kojima se miješanje podloge ostvaruje aeracijom. Upotreba ove vrste bioreaktora potaknula je značajan interes zahvaljujući postizanju visoke koncentracije biomase (> 80 g L<sup>-1</sup>) tijekom fotoautotrofne kultivacije (Brennan i Owende, 2010). Uvećanje mjerila je otežano, budući da s porastom volumena raste hidrostatski tlak (Yen i sur., 2013).

Cijevni fotobioreaktori u širokoj su upotrebi za komercijalnu proizvodnju. Obično su izrađeni od transparentnih polipropilen-akrilnih ili polivinil-kloridnih cijevi promjera do 0,1 m postavljenih horizontalno, vertikalno ili ukošeno. Recirkulacija podloge obavlja se pomoću pumpe ili *air-lift* sustava (Slika 3). Potonji se sastoji od uzlazne i silazne sekcije koje se nalaze u dijelu sustava za prihranu. Uzlazna sekcija se aerira i pritom omogućuje oslobađanje proizvedenog kisika koji se izvodi pri vrhu sustava, a podloga se kroz silaznu sekciju vraća u fotobioreaktor uz obogaćivanje ugljikovim dioksidom.

Dvostupanjskom kultivacijom mikroalgi primjenom kombinacije otvorenog i zatvorenog sustava moguće je povećati prinos specifičnog metabolita (Vieira-Costa i Greque de Morais, 2013). Hibridni sustav razvijen je s ciljem iskorištavanja prednosti svojstvenih svakom od navedenih tipova bioreaktora. Prvi stupanj provodi se u fotobioreaktoru, pri čemu kontrolirani uvjeti kultivacije smanjuju rizik od kontaminacije i omogućuju neometanu diobu stanica mikroalgi. Prirasla biomasa prebacuje se u otvoreni bazen gdje se stanice izlažu nutritivnom stresu, čime se potiče nakupljanje željenog metabolita (Brennan i Owende, 2010).



**Slika 3.** Cijevni fotobioreaktor (Brennan i Owende, 2010).

#### 2.4.2.2. Zatvoreni sustavi za heterotrofni uzgoj

Heterotrofne vrste mikroalgi kultiviraju se u konvencionalnim bioreaktorima s miješalom. S obzirom da su ove kulture neovisne o svjetlosnoj energiji, uvećanje mjerila bioreaktora je mnogo jednostavnije budući da je omjer površine i volumena znatno manji u usporedbi s fotobioreaktorima (Brennan i Owende, 2010). Veća mogućnost kontrole i niži troškovi izolacije proizvoda, neke su od prednosti pred fotobioreaktorima i otvorenim sustavima. Zahtjevi za kisikom, miješanjem, kontrolom temperature i nutrijentima u sterilnoj okolini su nužni. Stoga je važno uzeti u obzir dodatne troškove postrojenja za pripremu podloge i sterilizaciju bioreaktora. Budući da je u heterotrofnim uvjetima uzgoja kisik limitirajući faktor, aeracija uz dobro miješanje od presudne je važnosti.

## 2.5. IZDVAJANJE MIKROALGI POTPOMOGNUTO MIKROORGANIZMIMA

Posljednjih godina proizvodnja biogoriva iz lipida mikroalgi fokus je brojnih istraživanja (Chisti, 2007; Chen i sur., 2018; Dehaghani i Pirouzfard, 2018). Fotoautotrofna kultivacija mikroalgi još je uvijek tehnološki najinteresantnija zahvaljujući jednostavnosti procesa i niskim troškovima proizvodnje. Međutim, izdvajanje stanica iz kultivacijske podloge predstavlja jednu od najvećih prepreka komercijalizaciji biogoriva proizvedenih ovom tehnologijom. Primarni razlog poteškoća je niska koncentracija stanica u podlozi (Du i sur., 2019). Potreba za značajnom količinom energije čini proces izolacije ekonomski neisplativim, budući da cijena doseže i do 50 % ukupnih troškova proizvodnje biodizela (Wrede i sur., 2014). U upotrebi su brojne tehnike izdvajanja biomase, primjerice flotacija, centrifugiranje, sedimentacija, flokulacija, ultrazvučna agregacija, filtracija, kao i njihova kombinacija (Vieira Costa i Greque de Moraes, 2013; Allnut i Kessler, 2015). Visoki troškovi izolacije opravdani su isključivo za proizvodnju visokovrijednih proizvoda te stoga predstavljaju ograničenje ekonomičnoj proizvodnji biogoriva.

Bioflokulacija predstavlja potencijalnu alternativu tradicionalnim tehnikama izdvajanja, zahvaljujući značajnoj uštedi energije i minimalnom utjecaju na okoliš. Ova tehnika podrazumijeva izdvajanje potpomognuto biljnim polimerima, bakterijama, plijesnima te autoflokulaciju (Ummalyma i sur., 2017). Koncept bioflokulacije pomoću bakterija i plijesni zasniva se na ko-kultivaciji s mikroalgama u svrhu simulacije prirodnih simbiotskih zajednica. Poznato je da većina algi u prirodi obitava u konzorciju koji uključuje različite vrste mikroorganizama (Lian i sur., 2018). U takvoj zajednici mikroalge koegzistiraju s drugim mikroorganizmima u mutualističkom odnosu koji se očituje u razmjeni nutrijenata i energije uz proizvodnju korisnih staničnih metabolita. Idealnu mješovitu kulturu karakterizira simbioza autotrofne mikroalge i heterotrofnog mikroorganizma (Rashid i sur., 2019). Mikroalga fiksira CO<sub>2</sub> fotosintezom i prevodi ga u organske spojeve potrebne za ishranu heterotrofnog mikroorganizma, uz opskrbu kisikom. Metaboličkom razgradnjom izvora ugljika oslobađa se CO<sub>2</sub> koji je supstrat za fotosintezu. Karakteristike koje je potrebno uzeti u obzir prilikom odabira partnera su: netoksičnost, sposobnost koegzistiranja, podjednaka brzina rasta, utjecaj na povećanje prinosa biomase ili proizvoda mikroalgi, asimilacija nusproizvoda metabolizma mikroalgi, uklanjanje inhibitornih molekula i održavanje genetičke stabilnosti tijekom duljih perioda kultivacije (Padmaperuma i sur., 2017).

Brojna istraživanja istaknula su važnost bakterijskih ekstracelularnih polisaharida u agregaciji stanica mikroalgi (Lee i sur., 2013; Powell i Hill, 2013; Magdouli i sur., 2016). Pored



bakterija, značajan interes usmjeren je i prema iskorištavanju filamentoznih plijesni. Prednost njihove primjene u svrhu izdvajanja stanica mikroalgi iz podloge je višestruka. Filamentozne plijesni smatraju se svojevrsnim bioflokulacijskim sredstvom zahvaljujući sposobnosti formiranja peleta i visokoj efikasnosti adsorpcije stanica mikroalgi. Izdvajanje biomase mikroalgi potpomognuto plijesnima ne zahtijeva primjenu kemikalija ni utrošak energije (Wrede i sur., 2014), budući da je pelete iz podloge moguće ukloniti jednostavnom filtracijom ili sedimentacijom što je znatno jeftinije u odnosu na obradu suspenzije pojedinačnih stanica. Priroda interakcija mikroalgi i plijesni u mješovitoj kulturi slabo je razjašnjena. Smatra se da je osnova interakcije razlika u površinskom naboju stanica. Zeta potencijal stanica mikroalgi obično je negativan, u rasponu od -10 do -35 mV (Gultom i Hu, 2013). Fungalni micelij bogat je pozitivno nabijenim polisaharidima te predstavlja prikladnu površinu za adsorpciju stanica mikroalgi (Ummalyma i sur., 2017). Osim efikasnog izdvajanja stanica mikroalgi, uočen je pozitivan učinak na ukupan prinos biomase i lipida, uslijed sinergističkog djelovanja oleaginoznih plijesni i mikroalgi (Miranda i sur., 2015; Muradov i sur., 2015). S obzirom da je celuloza osnovna strukturna komponenta staničnih stijenki mnogih vrsta mikroalgi, pogodna je kultivacija s plijesnima koje posjeduju celulolitičku aktivnost (Gultom i Hu, 2013). U takvoj mješovitoj kulturi, koja *de facto* simulira prirodni lišaj, osiguran je supstrat za rast plijesni bez potrebe za dodatnim izvorom ugljika. Pored toga, djelomična degradacija stanične stijenke mikroalgi olakšava proces izolacije lipida iz biomase (Hu i sur., 2013).

Interes za industrijskom primjenom bioflokulacije pomoću mikroorganizama u kontinuiranom je porastu. Valja napomenuti da je ova tehnika primjenjiva isključivo za proizvodnju biogoriva, budući da podrazumijeva primjenu potencijalno patogenih mikroorganizama i kao takva se smatra neprikladnom za proizvodnju dodataka prehrani. Težnja je usmjerena prema pronalasku idealnih partnera za mješovitu kultivaciju s industrijski važnim sojevima mikroalgi. Potrebno je razjasniti mehanizme međudjelovanja dvaju mikroorganizama te u svrhu sistematizacije rezultata kreirati baze podataka koje će služiti kao vrijedan alat u daljnjim istraživanjima (Padmaperuma i sur., 2017). Razvoj strategije za komercijalnu primjenu zahtijeva detaljno istraživanje i definiranje uvjeta pri kojima se postiže maksimalna efikasnost bioflokulacije u industrijskom mjerilu (Rebah i sur., 2018).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

Za provedbu eksperimenata korišteni su mikroorganizmi navedeni u tablici 3.

**Tablica 3.** Mikroorganizmi korišteni u istraživanju.

mikroorganizam	zbirka
<i>Chlorella vulgaris</i> (C7)	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za BI, IM i TSP
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Z1)	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za BI, IM i TSP
<i>Scenedesmus</i> sp. (G)	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za BI, IM i TSP
<i>Aspergillus niger</i>	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Zbirka mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica
<i>Mortierella isabellina</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

##### 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga.

Za pripremu hranjivih podloga korištene su kemikalije navedene u tablici 4.

**Tablica 4.** Kemikalije za pripremu hranjivih podloga.

kemikalija	čistoća	proizvođač
glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
kvašćev ekstrakt	za mikrobiologiju	Liofilchem, Italija
natrijev nitrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
magnezijev sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev hidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska

**Tablica 4.** Kemikalije za pripremu hranjivih podloga (nastavak).

kemikalija	čistoća	proizvođač
kalijev dihidrogenfosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev klorid	p.a.	Alkaloid, Makedonija
etilendiamintetraoctena kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
željezov(II) sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
sumporna kiselina	96 %, p.a.	Carlo Erba, Italija
borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
činkov sulfat heptahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
manganov(II) klorid tetrahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
molibden(VI) oksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
bakrov sulfat pentahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
kobaltov(II) nitrat heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
krumpirov dekstrozni agar	za mikrobiologiju	Becton Dickinson, SAD
agar	za mikrobiologiju	Biolife, Italija
fruktoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
laktoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
galaktoza	p.a.	Difco, SAD
glicerol	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
octena kiselina	p.a.	Alkaloid, Makedonija
ksiloza	p.a.	Kemika, Hrvatska
arabinoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
celobioza	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
melasa	50 % saharoze, techn.	Sladorana, Hrvatska
cijanokobalamin	≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Njemačka
biotin	≥ 99 %	Sigma Aldrich, Njemačka
tiamin hidroklorid	≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Njemačka

## 3.1.3. Ostale kemikalije

Ostale kemikalije korištene u istraživanju prikazane su u tablici 5.

**Tablica 5.** Ostale kemikalije korištene u istraživanju.

kemikalija	čistoća	proizvođač
kloroform	p.a.	Acros Organics, SAD
metanol	za HPLC	J. T. Baker, SAD
etanol	apsolutni, p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
ampicilin	p.a.	Carl Roth, Austrija
Tween 80	p.a.	Merck, Njemačka
fosforna kiselina	za HPLC, $\geq 85$ %	Sigma-Aldrich, Njemačka
klorovodična kiselina	p.a., 36 %	Kemika, Hrvatska
trikloroetena kiselina	p.a.	Merck, Njemačka
natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
sumporna kiselina	p.a., 72 %	LabChem, SAD
pentadekan	standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
metil tridekanoat	standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
smjesa F.A.M.E (C4-C24)	standard	Sigma-Aldrich, Njemačka
heksan	za HPLC (GC), $\geq 97$ %	Sigma-Aldrich, Njemačka
aceton	p.a.	Kemika, Hrvatska
kalij, natrij-tartarat	p.a.	Kemika, Hrvatska
natrijev karbonat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
bakrov sulfat	p.a.	Alkaloid, Makedonija
albumin goveđeg seruma	$\geq 98$ %	Santa Cruz Biotech., SAD
kalcijev karbonat	p.a.	Kemika, Hrvatska
sredstvo protiv pjenjenja	-	Carl Roth, Austrija
pH puferi za kalibraciju	pH 4,01; 7; 9,21	Hamilton, Švicarska

## 3.1.4. Hranjive podloge za uzgoj monokulture mikroalgi

Za pripremu inokuluma i uzgoj kulture mikroalgi korištena je tekuća BB podloga (eng. *Bold's Basal Medium*) pogodna za kultivaciju slatkovodnih mikroalgi čiji je sastav prikazan u tablici 6. Kulture su održavane na krutim podlogama istog sastava uz dodatak 1,5 % (w/v) agara.

**Tablica 6.** Sastav BB podloge.

sastojak	koncentracija [mol L <sup>-1</sup> ]
NaNO <sub>3</sub>	$2,94 \cdot 10^{-3}$
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	$3,04 \cdot 10^{-4}$
NaCl	$4,28 \cdot 10^{-4}$
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	$4,31 \cdot 10^{-4}$
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,29 \cdot 10^{-3}$
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	$1,70 \cdot 10^{-4}$
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	$3,07 \cdot 10^{-5}$
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	$7,28 \cdot 10^{-6}$
MoO <sub>3</sub>	$4,93 \cdot 10^{-6}$
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	$6,29 \cdot 10^{-6}$
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	$1,68 \cdot 10^{-6}$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,85 \cdot 10^{-4}$
EDTA	$1,71 \cdot 10^{-4}$
KOH	$5,53 \cdot 10^{-4}$
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	$1,79 \cdot 10^{-5}$
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$1,8 \cdot 10^{-2}$

#### 3.1.4.1. Hranjiva podloga za ispitivanje i optimiranje rasta na različitim izvorima ugljika

U svrhu ispitivanja rasta različitih sojeva mikroalgi pripremljena je BB podloga u kojoj su otopljeni pojedinačni izvori ugljika. Rast je ispitan na 12 različitih izvora ugljika: glukozi, fruktozi, galaktozi, manozi, saharozi, maltozi, laktozi, ksilozi, arabinozi, glicerolu, melasi i octenoj kiselini. Koncentracija pojedinog izvora ugljika u podlozi iznosila je 5 g L<sup>-1</sup>. Podloga je obogaćena dodatkom 0,5 mL L<sup>-1</sup> f/2 otopine vitamina čiji je sastav prikazan u tablici 7. Kao kontrola korištena je podloga istog sastava, bez dodanog izvora ugljika.

Za optimiranje rasta mikroalgi pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika korištena je prethodno opisana podloga u kojoj je koncentracija izvora ugljika iznosila 10, 35, 50 odnosno 75 g L<sup>-1</sup>.

**Tablica 7.** Sastav f/2 otopine vitamina.

sastojak	koncentracija [ $\text{mol L}^{-1}$ ]
tiamin	$2,96 \cdot 10^{-7}$
biotin	$2,05 \cdot 10^{-9}$
cijanokobalamin	$3,69 \cdot 10^{-10}$

#### 3.1.4.2. Hranjiva podloga za optimiranje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika

Istraživanje rasta mikroalge *Chlorella vulgaris* provedeno je pri različitim početnim molarnim omjerima C:N u BB podlozi. Kao izvor ugljika odabrana je glukoza, a zadani omjeri C:N podešeni su dodatkom određene količine natrijevog nitrata. BB podloga je osim glukoze i natrijevog nitrata sadržavala  $2 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta. Pri izračunu potrebne količine natrijevog nitrata uzet je u obzir sadržaj dušika u kvašćevom ekstraktu (7 % w/w).

Za heterotrofni način uzgoja istražen je rast pri omjerima C:N 10 i 30  $\text{mol mol}^{-1}$  uz početnu koncentraciju glukoze  $20 \text{ g L}^{-1}$ . U miksotrofnim uvjetima omjeri C:N iznosili su 10, 30, 50 i  $75 \text{ mol mol}^{-1}$  uz početnu koncentraciju glukoze  $20 \text{ g L}^{-1}$ , odnosno 30 i  $50 \text{ mol mol}^{-1}$  pri  $50 \text{ g L}^{-1}$  glukoze. Za miksotrofni uzgoj korištena je BB podloga s dvostruko većom koncentracijom anorganskih soli.

#### 3.1.4.3. Hranjiva podloga za šaržni uzgoj s pritokom supstrata u laboratorijskom bioreaktoru

U svrhu heterotrofnog uzgoja mikroalge *Chlorella vulgaris* u bioreaktoru korištena je BB podloga dvostruko veće koncentracije anorganskih soli. Pripremljena podloga sadržavala je  $30 \text{ g L}^{-1}$  glukoze i  $4 \text{ g L}^{-1}$  kvašćevog ekstrakta. Početni omjer C:N podešen je na  $10 \text{ mol mol}^{-1}$  dodatkom izračunate mase natrijevog nitrata, pri čemu je u obzir uzet sadržaj dušika u kvašćevom ekstraktu. Prije inokulacije dodan je antibiotik ampicilin te je njegova koncentracija u podlozi iznosila  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Za prihranu su pripremljene koncentrirane otopine glukoze ( $700 \text{ g L}^{-1}$ ), natrijevog nitrata ( $340 \text{ g L}^{-1}$ ), kvašćevog ekstrakta ( $130 \text{ g L}^{-1}$ ) i pojedinačnih anorganskih soli.

#### 3.1.5. Hranjiva podloga za održavanje i uzgoj spora plijesni

Čiste kulture plijesni *A. niger*, *A. fumigatus* i *M. isabellina* čuvane su i održavane na kosim agaroznim podlogama. Za pripremu spora plijesni korišten je čvrsti PD agar (krumpirov dekstrozni agar).

### 3.1.6. Hranjive podloge za uzgoj mješovite kulture mikroalgi i plijesni

U svrhu uzgoja mješovite kulture mikroalge *Chlorella vulgaris* i plijesni *A. niger*, *A. fumigatus* i *M. isabellina* pripremljene su BB podloge omjera C:N 30 mol mol<sup>-1</sup> s dvostruko većom koncentracijom anorganskih soli. Početna koncentracija glukoze u podlozi iznosila je 20 g L<sup>-1</sup>, a kvašćevog ekstrakta 2 g L<sup>-1</sup>. Pri izračunu potrebne količine natrijevog nitrata uzet je u obzir sadržaj dušika u kvašćevom ekstraktu. Na jednak način pripremljene su kontrolne podloge za uzgoj pojedinačnih čistih kultura mikroalge i plijesni.

### 3.1.7. Oprema i aparatura

#### 3.1.7.1. Laboratorijski bioreaktor

U svrhu uzgoja mikroalge *Chlorella vulgaris* korišten je stakleni bioreaktor s dvostrukim plaštom (M2, B. Braun, Njemačka) ukupnog volumena 2 L (Slika 4) sa sustavima za kontrolu i regulaciju procesnih parametara (MD, B. Braun, Njemačka). Bioreaktor je opremljen s dvije Rushtonove turbine, pH elektrodom i sondom za mjerenje temperature (Pt100). Na poklopcu bioreaktora nalazi se sustav za uzorkovanje te priključci za punjenje, inokulaciju i korekciju pH-vrijednosti podloge. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod i odvod zraka na koje su spojeni filteri za sterilizaciju zraka. Protok zraka reguliran je pomoću rotametra. Broj okretaja miješala podešen je upotrebom analognog regulatora (Marus-Atm, Hrvatska).



**Slika 4.** Bioreaktor s miješalom.

#### 3.1.7.2. Centrifuge

Za izdvajanje biomase mikroalgi iz hranjive podloge korištena je centrifuga Beckman J-21B (SAD). U analitičke svrhe korištene su centrifuge Thermo Scientific SL 8 R (SAD), Tehnica HC-240 (Slovenija) i Eppendorf 5804 R (Njemačka). Ovisno o tipu centrifuge, uzorci su centrifugirani u plastičnim kivetama volumena 500, 50, 15, odnosno 1,5 mL.

#### 3.1.7.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Za određivanje koncentracije glukoze u supernatantu ili filtratu kulture korišten je HPLC uređaj CLASS-VP LC-10AVP 15 (Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od pumpe (LC-10ADVP), otplinjača (DGU-14A), automatskog injektora (SIL-10ADVP), termostata (CTO-10A VP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel C-610H; Sigma-Aldrich, SAD) s predkolonom (Supelcogel H; Sigma-Aldrich, SAD), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A VP) i računalnog programa za obradu podataka (CLASS-VP v6.10).

#### 3.1.7.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Za analizu najzastupljenijih monosaharida u hidrolizatu biomase mikroalgi korišten je UPLC uređaj 1290 Infinity II, (Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A), automatskog injektora (G7167B), termostata (G7116B), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H+; Phenomenex, SAD) s pretkolonom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS).

#### 3.1.7.5. Uređaj za plinsku kromatografiju (GC)

Profil metilnih estera masnih kiselina analiziran je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Sustav se sastoji od automatskog uzorkivača (AOC-20s), injektora (AOC-20i), termostatisirane kapilarne kolone (Zebron ZB-FAME Phenomenex, SAD), plameno-ionizacijskog detektora (FID-2010 Plus) i računalnog programa za obradu podataka (GC Solutions v2.32).



## 3.1.7.6. Ostala oprema i aparatura

Uz navedenu opremu, laboratorijski pribor i posuđe, u ovom istraživanju korištena je oprema prikazana u tablici 8.

**Tablica 8.** Ostala oprema i aparatura.

oprema	model i proizvođač
laboratorijska tresilica	Certomat RM; B. Braun, Njemačka
tresilica za mikrotitarske ploče	Compact Digital Microplate Shaker; Thermo Scientific, SAD
inkubatorska tresilica	TS-100; Biosan, SAD
autoklav	Sutjeska, Jugoslavija
UV/Vis spektrofotometar	Cary 100; Agilent Technologies, SAD
FT-IR spektrofotometar	Spectrum Two; Perkin Elmer, SAD
spektrofotometar za mikrotitarske ploče	Infinite F Plex; Tecan, Švicarska
mufolna peć	IP-08; Iskraterm, Slovenija
tehnička vaga	ET-1211; Tehnica, Slovenija
analitička vaga	ALC210.4; Acculab, SAD
vodena kupelj	VK3EN; InkoLab, Hrvatska
laboratorijski termostat-inkubator	BTE-S; Termo-medicinski aparati Bodalec & Havočić, Hrvatska
sušionik	ST-05; Instrumentaria, Hrvatska
mikroskop	CH20; Olympus, Japan
vortex mikser	LLG-uniTEXER 1; LLG-Labware, Njemačka
pH metar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprema inokuluma

##### 3.2.1.1. Uzgoj inokuluma mikroalgi

Inokulum mikroalgi pripremljen je postupnim povećanjem volumena kulture. Uzgoj je započet precjepljivanjem kulture s krute BB podloge u tekuću. U aseptičnim uvjetima stanice mikroalgi sastrugane su s površine kosog agara pomoću eze i prenijete u 50 mL prethodno sterilizirane BB podloge (poglavlje 3.1.4.) koja je po potrebi sadržavala 20 g L<sup>-1</sup> glukoze i 2 g L<sup>-1</sup> kvašćevog ekstrakta. Inokulum je uzgajan 5 - 7 dana na tresilici pri 200 rpm i temperaturi od 25 - 28 °C. Ovisno o namjeni inokuluma, uzgoj je proveden uz upotrebu umjetnog izvora svjetlosti tople bijele boje (2700K) prema režimu 12 sati svjetlo - 12 sati tama, odnosno bez prisustva svjetlosti. 20 mL uzgojene kulture prenijeto je u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL koja je sadržavala 180 mL sterilne podloge istog sastava te je inokulum uzgajan u prethodno opisanim uvjetima.

##### 3.2.1.2. Uzgoj spora plijesni

Plijesni *A. niger*, *A. fumigatus* i *M. isabellina* kultivirane su na kosom PD agaru (poglavlje 3.1.5.) tjedan dana pri temperaturi od 28 °C. U aseptičnim uvjetima spore plijesni sastrugane su s površine podloge i resuspendirane uz dodatak otopine Tween 80 koncentracije 1 g L<sup>-1</sup>. Nakon filtracije kroz sterilnu gazu, spore su pohranjene u hladnjaku na -20 °C.

#### 3.2.2. Ispitivanje rasta na različitim izvorima ugljika

U ovom eksperimentu testiran je rast mikroalgi *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. i *Scenedesmus* sp. na različitim izvorima ugljika u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima. Uzgoj je proveden u mikrotitarskim pločama s 96 jažica. Svaka jažica sadržavala je 180 µL sterilne BB podloge s odgovarajućim izvorom ugljika (poglavlje 3.1.4.1.). Pripremljene su po dvije paralele za svaki ispitivani izvor ugljika. Jažice su inokulirane s 20 µL prethodno uzgojenog inokuluma prema shemi prikazanoj na slici 5. Odabran je identičan raspored testiranih sojeva i izvora ugljika za obje vrste uzgoja. Uzgoj je proveden na tresilici pri temperaturi od 25 °C i 250 rpm tijekom 72 h. U slučaju miksotrofnog rasta, tijekom uzgoja korištena je topla bijela svjetlost uz režim 12 h svjetlo - 12 h tama. Prirast biomase mikroalgi određen je iz razlike optičke gustoće kulture pri 540 nm na početku i kraju uzgoja.

Z1	Z1	Z1	Z1	C7	C7	C7	C7	G	G	G	G
Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K
Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K	Glc	Gly	Gal	K
Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K
Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K	Fru	Xyl	Lac	K
Suc	Mal	Cel	K	Suc	Mal	Cel	K	Suc	Mal	Cel	K
Suc	Mal	Cel	K	Suc	Mal	Cel	K	Suc	Mal	Cel	K
Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K
Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K	Me50	Ara	HAc	K

**Slika 5.** Raspored izvora ugljika i nacijepljenih sojeva mikroalgi. *Glc* glukoza, *Fru* fruktoza, *Suc* saharoza, *Me50* melasa, *Gly* glicerol, *Xyl* ksiloza, *Mal* maltoza, *Ara* arabinoza, *Gal* galaktoza, *Lac* laktoza, *Cel* celobioza, *HAc* octena kiselina, *K* kontrola, *Z1* *Chlamydomonas* sp., *C7* *Chlorella vulgaris*, *G* *Scenedesmus* sp.

### 3.2.3. Optimiranje koncentracija odabranih izvora ugljika

Na temelju rezultata prethodno provedenog eksperimenta (poglavlje 3.2.2.) odabrana su po tri izvora ugljika za svaki ispitivani soj mikroalgi (*Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. i *Scenedesmus* sp). U svrhu optimiranja koncentracija odabranih izvora ugljika proveden je miksotrofni i heterotrofni uzgoj u mikrotitarskim pločama s 96 jažica. Svaka jažica sadržavala je 180  $\mu$ L sterilne BB podloge s odgovarajućim izvorom ugljika (poglavlje 3.1.4.1.). Pripremljene su po dvije paralele za svaku ispitivanu koncentraciju supstrata. Jažice su inokulirane s 20  $\mu$ L prethodno uzgojenog inokuluma prema shemi prikazanoj na slikama 6 i 7. Uzgoj je vođen pri uvjetima opisanim u poglavlju 3.2.2. Prirast biomase mikroalgi određen je iz razlike optičke gustoće kulture pri 540 nm na početku i kraju uzgoja.

Z1	Z1	Z1	Z1	C7	C7	C7	C7	G	G	G	G
Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 10 gL <sup>-1</sup>	Gal 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 10 gL <sup>-1</sup>	Gal 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 35 gL <sup>-1</sup>	Gal 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 35 gL <sup>-1</sup>	Gal 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 50 gL <sup>-1</sup>	Gal 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 50 gL <sup>-1</sup>	Gal 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 75 gL <sup>-1</sup>	Gal 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 75 gL <sup>-1</sup>	Gal 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K

**Slika 6.** Raspored izvora ugljika i naciepljenih sojeva mikroalgi u miksotrofnim uvjetima.

Z1	Z1	Z1	Z1	C7	C7	C7	C7	G	G	G	G
Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	Glc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 10 gL <sup>-1</sup>	Gal 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	Glc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 10 gL <sup>-1</sup>	Gal 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 10 gL <sup>-1</sup>	Suc 10 gL <sup>-1</sup>	HAc 10 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	Glc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 35 gL <sup>-1</sup>	Gal 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	Glc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 35 gL <sup>-1</sup>	Gal 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 35 gL <sup>-1</sup>	Suc 35 gL <sup>-1</sup>	HAc 35 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	Glc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 50 gL <sup>-1</sup>	Gal 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	Glc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 50 gL <sup>-1</sup>	Gal 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 50 gL <sup>-1</sup>	Suc 50 gL <sup>-1</sup>	HAc 50 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	Glc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 75 gL <sup>-1</sup>	Gal 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K
Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	Glc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Glc 75 gL <sup>-1</sup>	Gal 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K	Me50 75 gL <sup>-1</sup>	Suc 75 gL <sup>-1</sup>	HAc 75 gL <sup>-1</sup>	K

**Slika 7.** Raspored izvora ugljika i naciepljenih sojeva mikroalgi u heterotrofnim uvjetima.

### 3.2.4. Optimiranje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika

Heterotrofni uzgoj mikroalge *Chlorella vulgaris* pri različitim omjerima C:N proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, korisnog volumena 200 mL. Sastav podloga opisan je u poglavlju 3.1.4.2. Korekcija pH-vrijednosti podloge provedena je dodatkom 1 M NaOH pri čemu je početni pH iznosio 6,6. Tikvice s podlogama sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 min. Ohlađene podloge inokulirane su s 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma. Uzgoj je vođen šaržno na tresilici pri temperaturi od 25 °C i brzini rotacije od 200 rpm. Tijekom uzgoja iz tikvica je izuzimano po 2 mL uzorka svakih 24 h u svrhu praćenja optičke gustoće kulture i koncentracije glukoze u podlozi. Po završetku uzgoja kultura je centrifugirana 20 min pri 4000 rpm. Vlažna biomasa podvrgnuta je sušenju pri 50 °C, a supernatant je pohranjen na -20 °C do analize. Miksotrofni uzgoj proveden je uz umjetni izvor toplo bijele svjetlosti (2700 K) pri istim uvjetima uz iznimku temperature, koja je iznosila 28 - 32 °C.

### 3.2.5. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata u laboratorijskom bioreaktoru

Heterotrofni uzgoj mikroalge *Chlorella vulgaris* vođen je u laboratorijskom bioreaktoru. Osim hranjive podloge (poglavlje 3.1.4.3.), pripremljene su otopine za korekciju pH-vrijednosti (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 M NaOH) i otopina sredstva protiv pjenjenja koncentracije 50 g L<sup>-1</sup>. Za kalibraciju pH elektrode korišteni su puferi pH-vrijednosti 4,01; 7 i 9,21. Sterilizacija bioreaktora, zajedno sa svim potrebnim priključcima, vršila se u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 minuta. Pripremljene otopine, uključujući hranjivu podlogu, sterilizirane su zasebno u autoklavu pri istim uvjetima. Punjenje bioreaktora hranjivom podlogom izvršeno je pomoću peristaltičke pumpe. Temperatura sadržaja bioreaktora podešena je na 28 °C cirkulacijom rashladne vode kroz dvostruki plašt. Početni volumen podloge u bioreaktoru iznosio je 1,5 L. Podloga je inokulirana s 200 mL miksotrofno uzgojenog inokuluma koji je sadržavao  $2,7 \cdot 10^8$  stanica po mililitru kulture.

Proces je vođen šaržno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Iz bioreaktora je svakodnevno izuzimano po 100 mL uzorka u aseptičnim uvjetima u svrhu analize sastava biomase. Rast biomase praćen je gravimetrijskim određivanjem koncentracije suhe tvari, mjerenjem optičke gustoće kulture i određivanjem broja stanica u podlozi. Također, tijekom uzgoja praćena je potrošnja glukoze. Nakon 170 h uzgoja u bioreaktor je dodano 180 mL prihrane u obliku pojedinačnih koncentriranih otopina glukoze, kvašćevog ekstrakta, natrijevog nitrata i ostalih anorganskih soli BB podloge. Prihranjivanjem je u podlozi uspostavljen početni

omjer C:N ( $10 \text{ mol mol}^{-1}$ ). Druga prihrana volumena 100 mL u bioreaktor je dodana nakon 210 h uzgoja te je sadržavala isključivo vodenu otopinu glukoze. Broj okretaja miješala tijekom uzgoja podešen je na 150 rpm. Zadana pH-vrijednost podloge iznosila je 6,6 te je održavana automatskom regulacijom pritoka kiseline i lužine. S obzirom na porast koncentracije stanica u bioreaktoru, protok zraka nakon druge prihrane povećan je s 2 na  $3 \text{ L min}^{-1}$ . Sredstvo protiv pjenjenja dodavano je po potrebi. Proces je vođen ukupno 236 h te je po završetku uzgoja biomasa mikroalgi izdvojena iz podloge centrifugiranjem 20 min pri 4000 rpm. Talog je sušen u sušioniku pri  $50^\circ\text{C}$ , dok je supernatant pohranjen na  $-20^\circ\text{C}$  do analize.

### 3.2.6. Uzgoj mješovite kulture mikroalge i plijesni

Šaržni uzgoj mješovite kulture mikroalge *Chlorella vulgaris* i plijesni *A. niger*, *A. fumigatus* te *M. isabellina* proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Sastav podloga naveden je u poglavlju 3.1.6. Za svaku mješovitu kulturu pripremljena je kontrolna podloga za uzgoj monokulture mikroalge, odnosno plijesni. Korekcija pH-vrijednosti podloge provedena je dodatkom 1 M NaOH pri čemu je početni pH podloge iznosio 6,6. Tikvice s podlogama sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od  $121^\circ\text{C}$  tijekom 20 min. Eksperiment je započet naciepljivanjem 180 mL podloge s 20 mL miksotrofno uzgojenog inokuluma mikroalgi. Čiste kulture su uzgajane 96 h na tresilici pri 150 rpm i temperaturi od  $27^\circ\text{C}$  te su potom inokulirane suspenzijom spora plijesni. Početni omjer spora plijesni i stanica mikroalgi u podlozi iznosio je 1:60000. Istovremeno su inokulirane kontrolne podloge s  $2 \cdot 10^6$  spora plijesni. Uzgoj je nastavljen na tresilici pri gore navedenim uvjetima. Tijekom uzgoja korišten je umjetni izvor toplo-bijele svjetlosti (2700 K) uz režim 12 h svjetlo-12 h tama. Iz tikvica je povremeno izuzimano po 2 mL uzorka za kontrolu koncentracije glukoze i mikroskopski pregled kulture. Po završetku uzgoja prirasla biomasa u mješovitoj kulturi razdvojena je na dvije frakcije filtracijom kroz gazu. Filtrat koji je sadržavao isključivo stanice mikroalgi naknadno je centrifugiran 20 min pri 4000 rpm. Vlažna biomasa podvrgnuta je sušenju pri  $50^\circ\text{C}$ , a supernatant je pohranjen na  $-20^\circ\text{C}$  do analize.

### 3.2.7. Mikrobiološke i analitičke metode

#### 3.2.7.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Stanice mikroalgi i spore plijesni brojane su u Thomaovoj komorici. Prije nanošenja uzorka, Thomaova komorica isprana je destiliranom vodom i etanolom te dobro osušena. Zatim je kap suspenzije stanica, odnosno spora prenesena na površinu ugravirane mrežice i prekrivena pokrovnicom. Nakon fiksiranja pokrovnice pripravak je promatran pod mikroskopom pri povećanju 400 puta. Stanice su izbrojane u 7 velikih kvadrata te je ukupan broj stanica po mililitru izračunat prema izrazu:

$$N = \frac{16 \cdot n \cdot d}{10^{-4}} \quad [1]$$

gdje je:

n - srednja vrijednost broja stanica u izbrojanim kvadratima

d - razrjeđenje.

#### 3.2.7.2. Mjerenje optičke gustoće kulture

U svrhu praćenja rasta biomase mikroalgi mjerena je optička gustoća kulture pri valnoj duljini od 540 nm. Uzorci su prije mjerenja dobro homogenizirani. Po potrebi je priređeno prikladno razrjeđenje kulture.

#### 3.2.7.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase

Kultura je prethodno centrifugirana pri 6000 rpm tijekom 15 min uz ispiranje deioniziranom vodom u svrhu uklanjanja eventualnih ostataka podloge. Talog biomase osušen je u sušioniku pri 105 °C do konstantne mase. Koncentracija suhe tvari određena je prema izrazu:

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \quad [2]$$

gdje je:

$m_1$  - masa prazne kivete [g]

$m_2$  - masa kivete s talogom nakon sušenja [g]

$V_p$  - volumen podloge [L].

#### 3.2.7.4. Određivanje koncentracije glukoze u podlozi

Koncentracija glukoze u supernatantu kulture određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Alikvotu od 750  $\mu\text{L}$  dodan je jednak volumen 5 %-tne (w/v) otopine cinkovog sulfata u svrhu taloženja proteina. Suspenzija je centrifugirana 10 min pri 10000 g. Priređeno je prikladno razrjeđenje supernatanta te su uzorci prije analize profiltrirani kroz filter promjera pora 0,2  $\mu\text{m}$ .

Za pripremu otopina korištena je redistirana voda čija je vodljivost iznosila manje od 1  $\mu\text{S}$ . Kao mobilna faza korištena je otopina  $\text{H}_3\text{PO}_4$  koncentracije 0,1 % (w/v). 20  $\mu\text{L}$  uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55  $^\circ\text{C}$  i brzini protoka pokretne faze 0,5  $\text{mL min}^{-1}$ . Obrada dobivenih kromatograma izvršena je pomoću računalnog programa CLASS-VP v6.10. Koncentracija glukoze u uzorku određena je iz jednadžbe baždarnog pravca za standard glukoze. Baždarni dijagram prikazan je u prilogu 7.1.

#### 3.2.7.5. Identifikacija staničnih makromolekula primjenom FT-IR

Funkcijske skupine najzastupljenijih makromolekula u biomasi mikroalgi identificirane su na temelju spektara dobivenih primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom. Za analizu je uzeto 5 mg biomase, prethodno osušene na 105  $^\circ\text{C}$  i usitnjene u fini prah. Uzorak je u tankom sloju raspoređen po površini dijamantne prizme. Spektri su snimljeni ATR metodom u području između 4000  $\text{cm}^{-1}$  i 450  $\text{cm}^{-1}$  sa spektralnom rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ . Apsorpcijske vrpce karakteristične za proteine, ugljikohidrate i triacilglicerole identificirane su na temelju apsorpcijskih maksimuma istezanja pojedinih vrsta veza (Prilog 7.2).

#### 3.2.7.6. Određivanje ukupnih ugljikohidrata u biomasi mikroalgi

Identifikacija i kvantifikacija monosaharida u hidrolizatima biomase mikroalgi provedena je prema NREL metodi (Van Wyken i Laurens, 2013a). U staklene viala volumena 10 mL odvagano je 25 mg prethodno osušene i usitnjene biomase mikroalgi. Uzorku je dodano 250  $\mu\text{L}$  72 % (w/w) sumporne kiseline uz polagano miješanje. Viala su inkubirane 60 minuta u



termostatu na 30 °C uz miješanje sadržaja svakih 5 - 10 minuta. Nakon inkubacije u viale je dodano 7 mL deionizirane vode te su zapečaćene gumenim čepovima s aluminijskim poklopcem. Tako pripremljeni uzorci autoklavirani su 60 minuta pri 121 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, sadržaj viala je homogeniziran te je pomoću injekcijske igle uzet alikvot od 3 mL. pH-vrijednost alkvota podešena je na 5 dodatkom kalcijevog karbonata. Neutralizirani uzorci profiltrirani su kroz najlonski filter veličine pora 0,22 µm.

Koncentracija pojedinih monosaharida u hidrolizatima biomase određena je pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC). Kao mobilna faza korištena je 0,0025 M otopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Za pripremu mobilne faze korištena je redestilirana voda vodljivosti manje od 1 µS. 10 µL uzorka injektirano je i propušteno kroz kolonu pri temperaturi od 55 °C i brzini protoka mobilne faze 0,6 mL min<sup>-1</sup>. Obrada dobivenih kromatograma izvršena je pomoću računalnog programa OpenLAB CDS. Koncentracija najzastupljenijih monosaharida u uzorcima izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca za standarde glukoze, ksiloze i arabinoze. Baždarni dijagrami s pripadajućim jednadžbama pravaca prikazani su u prilogu 7.3. Udio pojedinih monosaharida u biomasi izračunat je prema izrazu [3] a njihova suma predstavlja ukupni udio ugljikohidrata u biomasi mikroalgi.

$$w_m = \frac{\gamma_m \cdot 7,25}{m_x} \cdot 100 \quad [3]$$

gdje je:

$\gamma_m$  - koncentracija monosaharida [mg mL<sup>-1</sup>]

$m_x$  - masa biomase [mg].

#### 3.2.7.7. Određivanje ukupnih lipida u biomasi mikroalgi

Lipidi iz biomase mikroalgi ekstrahirani su sa smjesom otapala metanol i kloroform prema promijenjenom propisu Bligh i Dyer (1959). Biomasa mikroalgi prethodno je osušena na 50 °C i usitnjena u tarioniku. U staklene viale odvagano je po 100 mg biomase. Uzorcima je dodano 4 mL metanola, 2 mL kloroforma i 0,4 mL vode. Sadržaj viala vorteksiran je 60 sekundi te je potom dodano još 2 mL kloroforma i 2 mL vode u svrhu razdvajanja faza. Ponovljeno je vorteksiranje kroz 60 sekundi. Suspendirana biomasa mikroalgi uklonjena je filtriracijom kroz sinter lijevak. Filtrat je izdvojen u čistu staklenu vialu, a talog biomase je ponovno podvrgnut

ekstrakciji sa smjesom metanola i kloroforma u omjeru 1:1 (v/v). Nakon filtracije dobiveni filtrat pridodan je prethodnom. Nakon razdvajanja faza, donja kloroformska faza prenijeta je pomoću injekcijske igle u prethodno izvaganu staklenu epruvetu. Kloroform je iz uzoraka uklonjen propuhivanjem s plinovitim dušikom. Ekstrahirani lipidi dodatno su osušeni u sušioniku pri 100°C kroz 60 minuta u svrhu uklanjanja eventualnih tragova vode zaostale u kloroformskoj fazi. Epruvete su nakon sušenja ohlađene u eksikatoru i izvagane na analitičkoj vagi. Udio lipida u biomasi mikroalgi izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$w_L = \frac{m_2 - m_1}{m_x \cdot (1 - w_{H_2O/x})} \cdot 100 [\%] \quad [4]$$

gdje je:

$m_1$  - masa prazne epruvete [g]

$m_2$  - masa epruvete s lipidima nakon sušenja [g]

$m_x$  - masa biomase uzeta u analizu [g]

$w_{H_2O/x}$  - udio vlage u biomasi.

#### 3.2.7.8. Određivanje koncentracije i profila masnih kiselina u biomasi mikroalgi

Sadržaj pojedinih masnih kiselina u lipidima mikroalgi određen je plinskom kromatografijom. Analizi je prethodila *in situ* transesterifikacija masnih kiselina prema NREL protokolu za određivanje ukupnih lipida (Van Wyken i Laurens, 2013b). U staklene vialje izvagano je 5 - 10 mg prethodno osušene (50 °C) i usitnjene biomase mikroalgi. Uzorcima je dodano 20 µL prethodno pripremljenog standarda metil tridekanoata (C13:0 ME,  $\gamma$  = 10 mg mL<sup>-1</sup>), 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL 0,6 M otopine HCl u metanolu. Vialje su zatvorene teflonskim čepovima i nakon vorteksiranja inkubirane u vodenoj kupelji pri 85 °C tijekom 60 minuta. Ohlađenim uzorcima dodan je 1 mL heksana te je smjesa dobro promiješana i ostavljena na sobnoj temperaturi najmanje 60 minuta u svrhu razdvajanja faza. Gornja faza izdvojena je u zasebnu vialu i razrijeđena 3 puta s heksanom. Razrijeđenom uzorku je prije kromatografske analize dodan određeni volumen internog standarda pentadekana koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> (5 µL na 200 µL uzorka).

2 µL uzorka analizirano je na plinskom kromatografu. Kao mobilna faza korišten je helij čiji je protok iznosio 1,2 mL min<sup>-1</sup>. Identifikacija masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja njihovih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih

estera standardne smjese 37 masnih kiselina (C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina normalizirane su prema količini standarda C13:0 ME [5] i izražene masenim udjelom u suhoj tvari biomase [6]:

$$m_{\text{FC13 norm.}} = \frac{\gamma_{\text{F}}}{\gamma_{\text{C13}}} \cdot m_{\text{C13}} \quad [5]$$

$$w_{\text{F}} = \frac{m_{\text{F,C13 norm.}}}{m_{\text{u}}} \cdot 100 \quad [6]$$

gdje je:

$\gamma_{\text{F}}$  - koncentracija metilnog estera masne kiseline [ $\text{mg L}^{-1}$ ]

$\gamma_{\text{C13}}$  - koncentracija standarda metil tridekanoata [ $\text{mg L}^{-1}$ ]

$m_{\text{C13}}$  - masa dodanog standarda metil tridekanoata [mg]

$m_{\text{u}}$  - masa suhe biomase [mg].

### 3.2.7.9. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a* i *b*

Analizi je prethodila ekstrakcija pigmenata iz vlažne biomase mikroalgi 90 %-tnim (v/v) acetonom uz mehaničku dezintegraciju stanica pomoću staklenih kuglica. 10 mL stanične kulture centrifugirano je pri 7000 rpm tijekom 10 minuta. Supernatant je odbačen, a talogu biomase dodano je 2 g staklenih kuglica i 2 mL 90 %-tnog (v/v) acetona. Kivete su zaštićene aluminijskom folijom u svrhu sprječavanja raspada fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Suspenzija je dva do tri puta naizmjenično vorteksirana 30 sekundi uz hlađenje na ledu, a potom centrifugirana 5 minuta pri 7000 rpm. Supernatant je izdvojen u čistu epruvetu, a preostala biomasa ponovo je podvrgnuta postupku ekstrakcije. Ekstrakcija je ponavljana do potpunog obezbojenja biomase pri čemu su supernatanti nakon svakog koraka ekstrakcije sakupljeni su u istu epruvetu.

Koncentracija pigmenata ekstrahiranih iz biomase mikroalgi određena je spektrofotometrijski prema metodi koju su predložili Jeffrey i Humphrey (1975). Dobivenim ekstraktima određena je apsorbancija pri valnim duljinama od 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm. Koncentracija [ $\text{mg L}^{-1}$ ] klorofila *a* i *b* određena je pomoću jednadžbi:

$$\text{Klorofil a} = \frac{11,85 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) - 1,54 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 0,08 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}) \cdot V_{\text{e}}}{\alpha \cdot V_{\text{f}}} \quad [7]$$

$$\text{Klorofil b} = \frac{-5,43 \cdot (\text{OD}_{664} - \text{OD}_{750}) + 21,03 \cdot (\text{OD}_{647} - \text{OD}_{750}) - 2,66 \cdot (\text{OD}_{630} - \text{OD}_{750}) \cdot V_e}{\alpha \cdot V_f} \quad [8]$$

gdje je:

$V_e$  - ukupni volumen ekstrakta [mL]

$V_f$  - volumen kulture uzet za ekstrakciju [mL]

$\alpha$  - faktor korekcije.

### 3.2.7.10. Određivanje udjela proteina u biomasi mikroalgi

Ekstrakcija proteina provedena je prema modificiranoj metodi Slocombe i sur. (2013). Za analizu proteina izvagano je 5 mg suhe biomase mikroalgi i resuspendirano u 200  $\mu\text{L}$  24 % (w/v) trikloroetene kiseline (TCA). Uzorci su inkubirani u vodenoj kupelji pri temperaturi od 85 °C tijekom 15 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, uzorcima je dodano 600  $\mu\text{L}$  vode HPLC čistoće u svrhu razrjeđivanja početne koncentracije TCA na 6 % (w/v). Homogenati su centrifugirani 20 min pri 14000 g i temperaturi od 4 °C. Supernatant je odbačen, a talog resuspendiran u 500  $\mu\text{L}$  0,1 M NaOH. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su u vodenoj kupelji na 65°C tijekom 2 h. Nakon hlađenja uzoraka provedeno je centrifugiranje 30 min pri 10000 g i sobnoj temperaturi. Talog je odbačen, a supernatant pohranjen na -20°C do daljnje analize.

Koncentracija proteina određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). U analizu je uzeto 40  $\mu\text{L}$  ekstrakta proteina. Ekstraktu je dodano 1200  $\mu\text{L}$  Bradford reagensa te je smjesa inkubirana tijekom 15 min na sobnoj temperaturi. Slijepa proba sadržavala je 40  $\mu\text{L}$  deionizirane vode umjesto uzorka. Apsorbancija uzorka izmjerena je pri 595 nm. Prema jednadžbi baždarnog pravca (Prilog 7.4.) izračunata je koncentracija proteina u uzorku. Udio proteina u biomasi izračunat je iz izraza:

$$w_p = \frac{\gamma_p \cdot V_e}{m_u} \cdot 100 \quad [9]$$

gdje je:

$\gamma_p$  - koncentracija proteina [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

$V_e$  - ukupni volumen ekstrakta [mL]

$m_u$  - masa suhe biomase [mg].

### 3.2.7.11. Određivanje sadržaja pepela u biomasi mikroalgi

Udio pepela u biomasi mikroalgi određen je gravimetrijski. U čiste, prethodno žarene i izvagane porculanske lončice odvagano je 500 mg biomase osušene pri 50 °C. Uzorak je sušen pri temperaturi od 105 °C u sušioniku do konstantne mase te je početna masa korigirana za sadržaj vlage. Prije žarenja u mufolnoj peći lončići s biomasom zagrijavani su na Bunsenovom plameniku do potpune karbonizacije. Lončići s biomasom prenijeti su u mufolnu peć prethodno zagrijanu na 550 °C i žareni do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru do sobne temperature lončići su izvagani s točnošću  $\pm 0,001$  g. Udio pepela u biomasi izračunat je prema izrazu:

$$w_p = \frac{m_p}{m_u \cdot (1 - w_{H_2O})} \cdot 100 [\%] \quad [10]$$

gdje je:

$m_p$  - masa pepela [mg]

$m_u$  - masa uzorka [mg]

$w_{H_2O}$  - udio vode u uzorku.

### 3.2.7.12. Određivanje pokazatelja uspješnosti bioprocesa

Pokazatelji uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbama [11], [12], [13] i [14].

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X}{X_0} \quad [11]$$

$\mu$  - specifična brzina rasta [ $h^{-1}$ ]

$X$  - koncentracija biomase u vremenu  $t_n$  [ $g L^{-1}$ ]

$X_0$  - početna koncentracija biomase [ $g L^{-1}$ ]

$\Delta t$  - interval vremena ( $t_n - t_0$ ).

$$Pr_X = \frac{X}{t_u} \quad [12]$$

$Pr_X$  - produktivnost sinteze biomase [ $g L^{-1} dan^{-1}$ ]

$X$  - koncentracija biomase u vremenu  $t_n$  [ $g L^{-1}$ ]

$t_u$  - trajanje uzgoja [dan].

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [13]$$

$Y_{X/S}$  - koeficijent konverzije supstrata u biomasu [ $\text{g g}^{-1}$ ]

$X_0$  - početna koncentracija biomase [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$X$  - koncentracija biomase na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$S_0$  - početna koncentracija supstata [ $\text{g L}^{-1}$ ]

$S$  - koncentracija supstrata na kraju uzgoja [ $\text{g L}^{-1}$ ].

$$t_g = \ln 2 \cdot \frac{\Delta t}{\ln \frac{N}{N_0}} \quad [14]$$

$t_g$  - generacijsko vrijeme [h],

$\Delta t$  - interval vremena ( $t_n - t_0$ )

$N_0$  - broj stanica u vremenu  $t_0$

$N$  - broj stanica u vremenu  $t_n$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Budući da su korišteni sojevi mikroalgi prethodno izolirani iz rijeke Gacke i identificirani na temelju morfoloških karakteristika (Čorak, 2018), cilj ovog istraživanja bio je usmjeren prema ispitivanju njihovih fizioloških značajki u svrhu razjašnjavanja mogućnosti biotehnoške primjene. Naknadna analiza molekularnih markera soja C7 u suradnji s zbirkom mikroorganizama *Roscoff Culture Collection* (Francuska) potvrdila je prethodnu pretpostavku da je izolirana mikroalga roda *Chlorella* i vrste *vulgaris*. Koncept istraživanja temeljen je na nizu eksperimenata koji su uključivali postepeno uvećanje mjerila kulture, pri čemu se odabir uvjeta kultivacije zasnivao na saznanjima izvedenim na osnovi prethodno provedenih eksperimenata.

Tematika istraživanja odnosi se na miksotrofnu i heterotrofnu kultivaciju mikroalgi budući da su u teorijskom dijelu ovog rada istaknute njihove tehnološke prednosti pred fotoautotrofnom kultivacijom. Stoga je od velike važnosti bio odabir izvora ugljika koji omogućuje optimalan rast stanica. Preliminarna istraživanja učinka različitih izvora ugljika na rast mikroalgi omogućila su odabir najpogodnijeg soja i supstrata za daljnju optimizaciju kultivacije. Poznato je da molarni omjer ugljika i dušika u većoj mjeri utječe na produktivnost rasta i sinteze željenog proizvoda. Tijekom uzgoja pri različitim molarnim omjerima C:N istražen je njihov učinak prvenstveno na rast i biosintezu rezervnih makromolekula s obzirom na poznatu činjenicu da limitacija dušikom pri višim omjerima C:N potiče njihovu akumulaciju u stanicama mikroalgi. Također, u istu svrhu ispitan je zajednički utjecaj povišene koncentracije izvora ugljika i anorganskih soli te temperature. Uzimajući u obzir prethodna saznanja o rastu soja *Chlorella vulgaris*, proveden je heterotrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata u laboratorijskom bioreaktoru. S obzirom da se sastav biomase intenzivno mijenja ovisno o fazi rasta, promatrane su kvalitativne i kvantitativne promjene makromolekulskog sastava stanice tijekom kultivacije.

U poglavlju 2.5. opisane su prednosti bioflokulacije kao alternativne tehnike izdvajanja stanica mikroalgi iz podloge. Ipak, trenutni izazovi uključuju pronalazak idealnih partnera i optimizaciju uzgoja mješovite kulture. U ovom istraživanju ispitana je efikasnost izdvajanja mikroalge *Chlorella vulgaris* u laboratorijskom mjerilu pomoću plijesni *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina*.

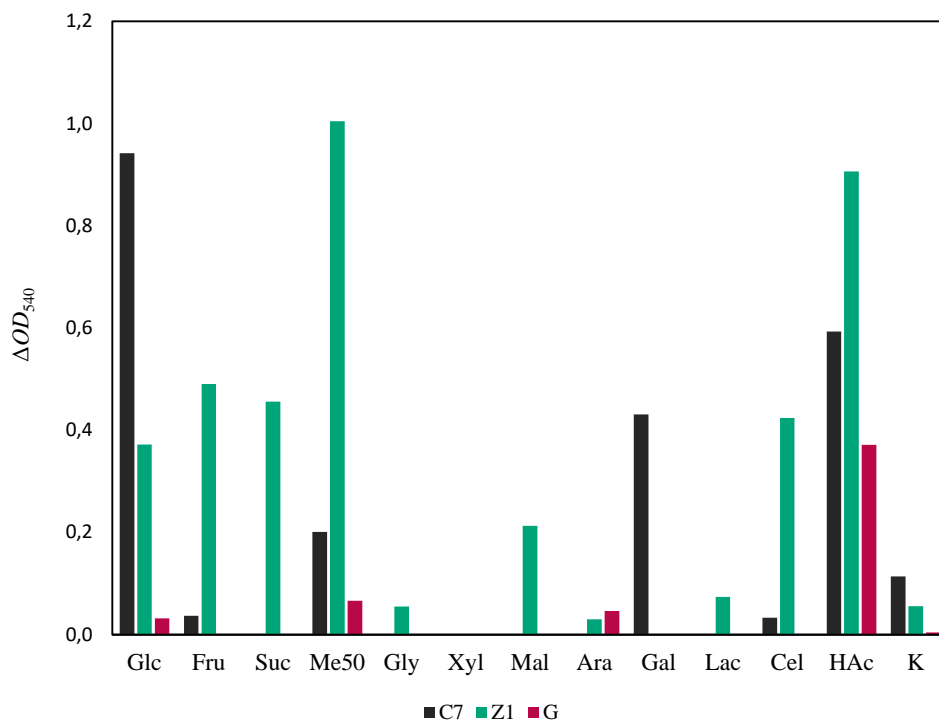
#### 4.1. RAST NA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJIKA

Prethodno su spomenute prednosti miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja na rast mikroalgi. Međutim, efikasnost asimilacije pojedinog izvora ugljika razlikuje se među vrstama. Na slikama 8 i 9 prikazan je prirast biomase tijekom miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja pojedinog soja na različitim izvorima ugljika te njihova usporedba s kontrolom. Porast biomase određen je mjerenjem optičke gustoće podloge.

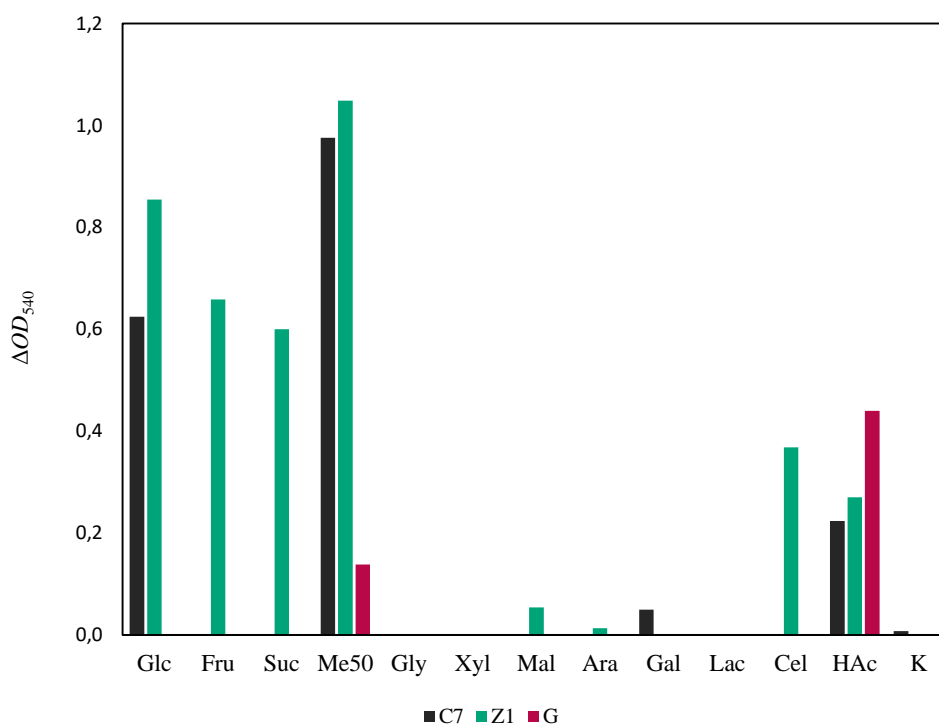
Za miksotrofnu i heterotrofnu kultivaciju mikroalgi se kao izvor ugljika najčešće upotrebljava glukoza, zahvaljujući postizanju visokih brzina rasta. Razlog tome je pridobivanje veće količine energije razgradnjom mola glukoze, u odnosu na ostale izvore ugljika. Asmilacija glukoze u stanicama mikroalge *Chlorella vulgaris* ne iznenađuje, budući da je poznato da vrste iz roda *Chlorella* posjeduju inducibilni sustav za simport glukoze s  $H^+$  ionima (Perez-Garcia i sur., 2011). Mnogi autori navode glukozu kao optimalan supstrat za rast ove vrste (Sharma i sur., 2016; Daliry i sur., 2017; Alves da Silva i Fonseca, 2018). Scarsella i sur. (2010) uočili su da je veća produktivnost sinteze biomase postignuta tijekom miksotrofne kultivacije na glukozu, u odnosu na heterotrofnu kultivaciju. U ovom istraživanju također je zabilježen veći porast optičke gustoće kulture tijekom miksotrofne kultivacije. Ipak, značajno slabiji rast na glukozu tijekom miksotrofnog uzgoja pokazali su sojevi *Chlamydomonas* sp. i *Scenedesmus* sp. Međutim, u usporedbi s ostalim ispitivanim sojevima, tijekom heterotrofne kultivacije zabilježen je veći prirast biomase *Chlamydomonas* sp. U poglavlju 2.3.1. spomenuto je da tijekom heterotrofnog rasta mikroalgi dominira razgradnja glukoze pentoza-fosfatnim putem. Značajniji rast ovog soja može se objasniti većom brzinom metaboličkog fluksa u odnosu na Embden-Meyerhof-Parnasov put koji je aktivan u prisustvu svjetlosti (Perez-Garcia i Bashan, 2015).

Od ostalih heksoza, isključivo se galaktoza pokazala prikladnim izvorom ugljika za miksotrofni rast soja *C. vulgaris*, dok je kod ostalih sojeva rast na galaktozi u potpunosti izostao. Rast je u značajno manjoj mjeri zabilježen i u heterotrofnim uvjetima što potvrđuje rezultate ranijih istraživanja (Dvořáková-Hladká, 1966). S druge strane, soju *Chlamydomonas* sp. pogodovao je rast na fruktozi u heterotrofnim i miksotrofnim uvjetima. Također, valja zamijetiti da je rast na disaharidima svojstven isključivo navedenom soju. Interesantan je značajan prirast soja *C. vulgaris* na melasi u heterotrofnim uvjetima, dok je na saharozu u potpunosti izostao. Slična pojava zamijećena je i u literaturi (Vidotti i sur., 2014). Naime, melasa šećerne repe uz saharozu sadrži i manje količine glukoze te fruktoze. Pored toga, ova kompleksna podloga bogat je izvor dušika te sadrži različite metalne ione i vitamine koji pogoduju rastu mikroalgi.





**Slika 8.** Usporedba miksotrofnog rasta sojeva *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. i *Scenedesmus* sp. na različitim izvorima ugljika. (Kratice su objašnjene u poglavlju 3.2.2).



**Slika 9.** Usporedba heterotrofnog rasta sojeva *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. i *Scenedesmus* sp. na različitim izvorima ugljika.

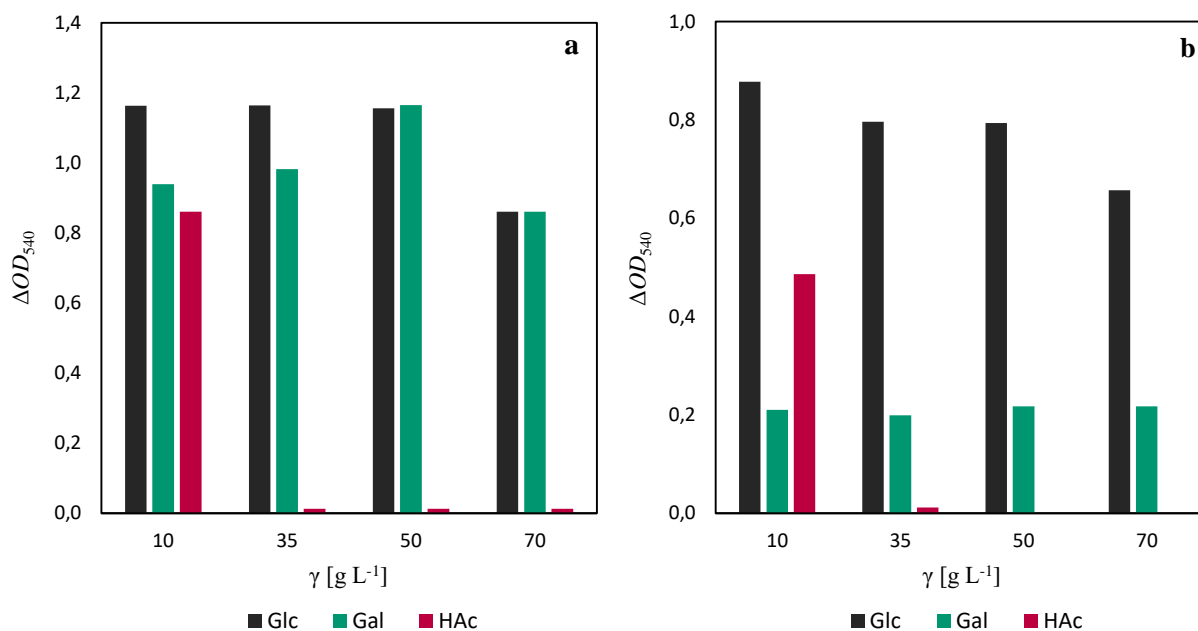
Asmiliacija različitih izvora ugljika općenito se pokazala slabom u soja *Scenedesmus* sp. Iznimka je octena kiselina pri kojoj je zabilježen višestruko veći porast u odnosu na kontrolu te sukladno literaturi podjednak rast tijekom miksotrofne i heterotrofne kultivacije (Dvořáková-Hladká, 1966). Za rast na acetatu stanici su potrebni ključni enzimi glioksilatnog ciklusa - izocitrat liaza i malat sintetaza. Combres i sur. (1994) zamijetili su značajan porast aktivnosti izocitrat liaze tijekom heterotrofne kultivacije *Scenedesmus obliquus*. Analogno, dodatak acetata fotoautotrofno uzgajanoj kulturi omogućio je povećanje specifične brzine rasta. U usporedbi s rezultatima koje su naveli Vidotti i sur. (2014), očekivan je veći porast biomase *Scenedesmus* sp. na melasi. U literaturi se također navodi zadovoljavajuć rast na glukozi i celobiozi u heterotrofnim, te glukozi, fruktozi, galaktozi, maltozi i celobiozi u miksotrofnim uvjetima (Dvořáková-Hladká, 1966). Valja uzeti u obzir da afinitet prema pojedinom izvoru ugljika može značajno varirati unutar vrsta istog roda te je u ovom slučaju nužna analiza genetskih markera primijenjenog soja u svrhu potpunijeg razumijevanja metaboličkih procesa u stanicama. S obzirom da je ispitivani soj tijekom rasta pokazivao tendenciju agregiranja, moguće je da mjerenje optičke gustoće nije primjerena metoda praćenja njegovog rasta. Također, acetat se pokazao prikladnim izvorom ugljika za miksotrofnu kultivaciju *Chlamydomonas* sp. i *C. vulgaris*. U stanicama *C. vulgaris* izocitrat liaza se eksprimira konstitutivno, no glioksilatni ciklus je funkcionalan isključivo u prisustvu acetata (Perez-Garcia i sur., 2011).

Mogućnost primjene otpadnog glicerola kao nusproizvoda proizvodnje biodizela za kultivaciju mikroalgi intenzivno se istražuje. Međutim, za sve ispitivane sojeve, uočen je izostanak rasta primjenom oba načina uzgoja. Slična situacija vezana je uz primjenu laktoze i maltoze. Općenito je poznato da mikroalge slabo rastu na ovim izvorima ugljika (Perez-Garcia i sur., 2011). Ova pojava vjerojatno je posljedica izostanka membranskih permeaza koje sudjeluju u transportu laktoze i maltoze u stanicu. Nemogućnost asimilacije saharoze vjerojatno je povezana s izostankom ekstracelularnog enzima invertaze kod mikroalgi *C. vulgaris* i *Scenedesmus* sp. Također, očigledno je da pentoze inhibiraju rast svih ispitivanih sojeva.

Rezultati provedenog eksperimenta služili su kao koristan temelj za planiranje daljnjih eksperimenata. Ipak, s obzirom da je uzgoj proveden u izrazito malim volumenima, potrebno je uzeti u obzir isparavanje podloge, neučinkovito miješanje i potencijalnu limitaciju kisikom tijekom heterotrofnog uzgoja. Ovim eksperimentom nedvojbeno je utvrđeno da je rast biomase višestruko veći uz odgovarajući organski izvor ugljika u usporedbi s fotoheterotrofnim uzgojem.

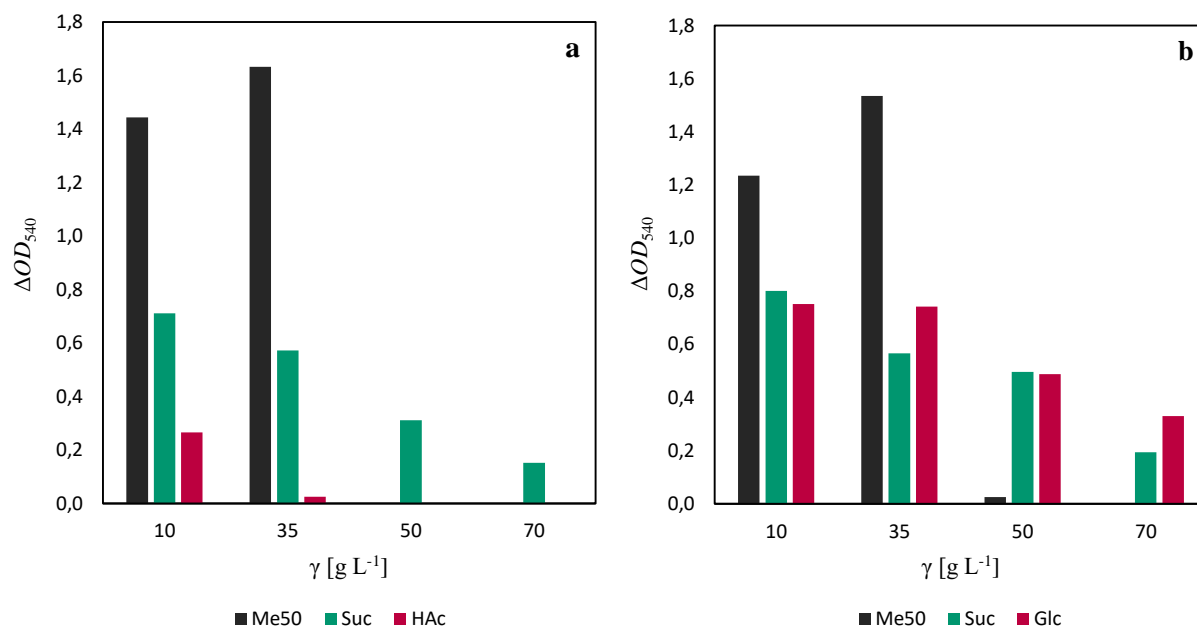
#### 4.2. RAST PRI RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA IZVORA UGLJIKA

Na temelju rezultata prethodnog istraživanja, odabrana su po 3 izvora ugljika za svaki ispitivani soj mikroalgi te je istražen učinak njihove koncentracije na rast. Slike 10, 11 i 12 prikazuju prirast biomase tijekom miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja pojedinog soja pri različitim koncentracijama izvora ugljika. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost optičke gustoće paralela.

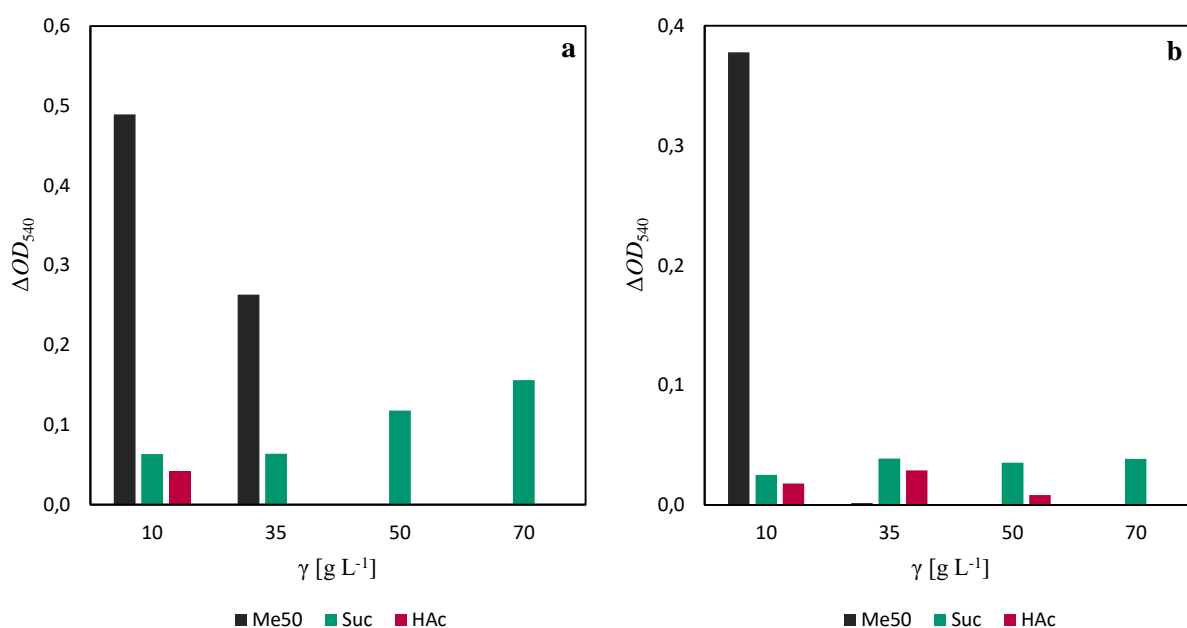


**Slika 10.** Usporedba miksotrofnog (a) i heterotrofnog (b) rasta soja *Chlorella vulgaris* pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika.

Postojan miksotrofni rast mikroalge *C. vulgaris* uočen je pri koncentracijama glukoze od 10 - 50 g L<sup>-1</sup>. Očigledno je da pri višim koncentracijama nastupa inhibicija supstratom. Galaktoza se također pokazala prikladnom za miksotrofnu kultivaciju u širokom rasponu koncentracija. Prema rezultatima vidljivo je da svjetlost pospješuje rast na organskim izvorima ugljika. Zamjetan prirast biomase ostvaren je tijekom uzgoja na octenoj kiselini koncentracije 10 g L<sup>-1</sup>. Međutim, porastom koncentracije octene kiseline, dolazi do potpune inhibicije rasta. Nizak pH podloge omogućuje difuziju nedisocirane kiseline u stanicu, te njenu disocijaciju u citosolu. Ovaj efekt uočen je i kod ostalih sojeva. Očekivano, u heterotrofnim uvjetima rast na svim testiranim izvorima ugljika bio je slabiji.



**Slika 11.** Usporedba miksotrofnog (a) i heterotrofnog (b) rasta soja *Chlamydomonas* sp. pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika.



**Slika 12.** Usporedba miksotrofnog (a) i heterotrofnog (b) rasta soja *Scenedesmus* sp. pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika.

Podjednak trend rasta s obzirom na vrstu uzgoja i izvor ugljika uočen je kod soja *Chlamydomonas* sp. Tijekom miksotrofnog uzgoja, koncentracije melase manje od 35 g L<sup>-1</sup> rezultirale su rastom biomase, dok je daljnje povećanje koncentracije uzrokovalo potpunu inhibiciju rasta nekom od komponenata melase. Saharoza u ovom slučaju nije toliko snažan inhibitor što je vidljivo zamjetnim rastom biomase porastom njene koncentracije. Sličan je učinak inhibicije uočen porastom koncentracije octene kiseline. U heterotrofnim uvjetima uzgoja povećanje koncentracije glukoze i saharoze inhibira rast, dok je povećanjem koncentracije melase taj učinak, kao i kod miksotrofnog uzgoja, drastično izraženiji. U odnosu na ostale sojeve, prirast *Scenedesmus* sp. značajno je slabiji. Valja primjetiti rast biomase proporcionalan koncentraciji saharoze u miksotrofnim uvjetima, ali i znatno veću osjetljivost na melasu u heterotrofnim uvjetima gdje do potpune inhibicije dolazi već pri koncentraciji od 35 g L<sup>-1</sup>.

#### 4.3. RAST PRI RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA IZVORA DUŠIKA

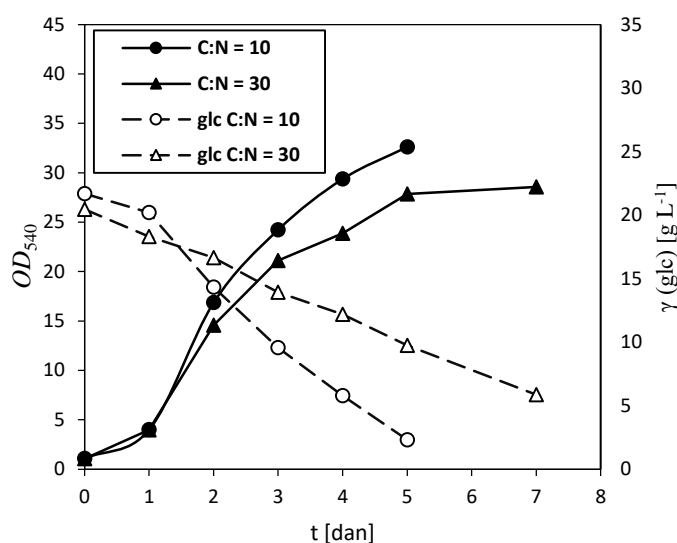
Prethodni eksperimenti služili su kao temelj za odabir soja mikroalge i najpogodnijeg izvora ugljika za daljnje istraživanje. Budući da je *Chlorella vulgaris* pokazala stabilan miksotrofni i heterotrofni rast na glukozi u rasponu od 10 - 50 g L<sup>-1</sup>, odabrana je za sljedeće istraživanje. Osim izvora ugljika, vrlo je važna opskrba izvorima dušika, fosfora i sumpora koji omogućuju normalan rast i funkcioniranje stanica. Posebice molarni omjer ugljika i dušika utječe na rast i proizvodnju specifičnih proizvoda metabolizma.

##### 4.3.1. Učinak različitih omjera C:N na rast i nakupljanje rezervnih makromolekula

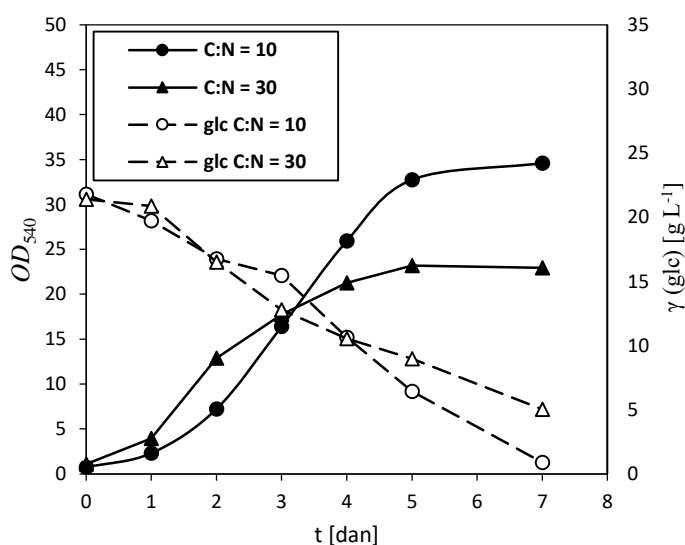
U ovom eksperimentu istražen je učinak molarnih omjera C:N na rast i nakupljanje lipida i ugljikohidrata. Slike 13 i 14 prikazuju krivulje rasta i promjenu koncentracije glukoze u podlozi tijekom miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja pri različitim koncentracijama natrijevog nitrata. Vrijednosti pokazatelja uspješnosti i koncentracije biomase pri omjerima C:N 10 i 30 za obje vrste uzgoja prikazane su u tablici 9. Uočljivo je da je pri nižim omjerima C:N prirast biomase veći, a sukladno tome i produktivnost sinteze biomase. Valja primijetiti i da je razlika između prinosa pri različitim omjerima C:N u heterotrofnim uvjetima veća nego u miksotrofnim uvjetima uzgoja. Vrijednost koeficijenta konverzije u svim je slučajevima bila podjednaka.

**Tablica 9.** Pokazatelji uspješnosti biosinteze biomase tijekom šaržnog miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja u tikvicama.

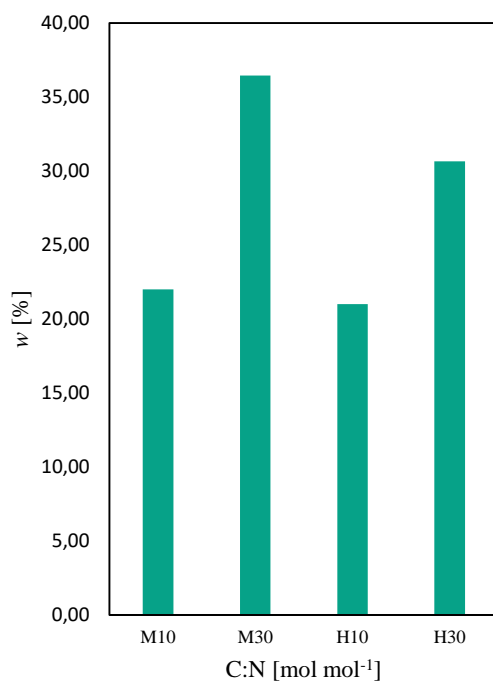
način uzgoja	C:N [mol mol <sup>-1</sup> ]	X [g L <sup>-1</sup> ]	Y <sub>X/S</sub> [g g <sup>-1</sup> ]	Pr [g L <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> ]
miksotrofno	10	8,5800	0,4429	1,7160
miksotrofno	30	7,4800	0,5125	1,0686
heterotrofno	10	10,2550	0,4907	1,4650
heterotrofno	30	6,9150	0,4229	0,9879



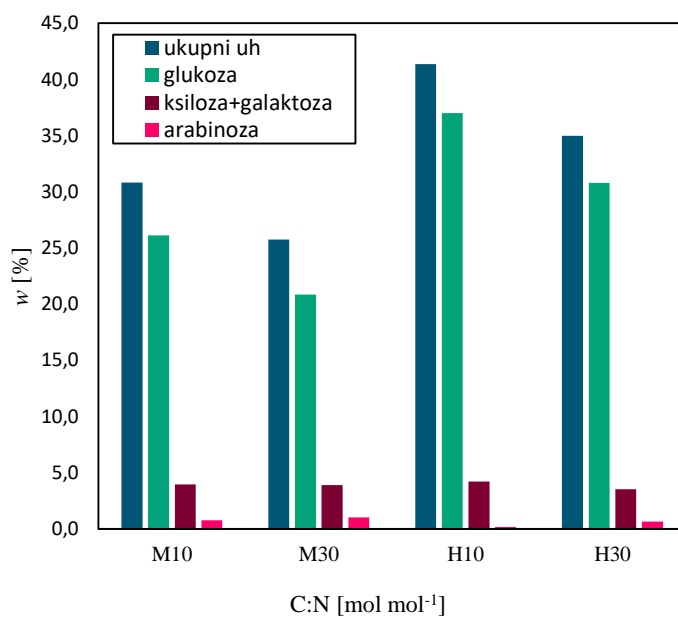
**Slika 13.** Miksotrofni rast soja *Chlorella vulgaris* pri različitim molarnim omjerima C:N.



**Slika 14.** Heterotrofni rast soja *Chlorella vulgaris* pri različitim molarnim omjerima C:N.



**Slika 15.** Promjena udjela lipida pri različitim molarnim omjerima C:N tijekom miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja. M *miksotrofni uzgoj*, H *heterotrofni uzgoj*.



**Slika 16.** Promjena udjela ugljikohidrata (uh) pri različitim molarnim omjerima C:N u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima.

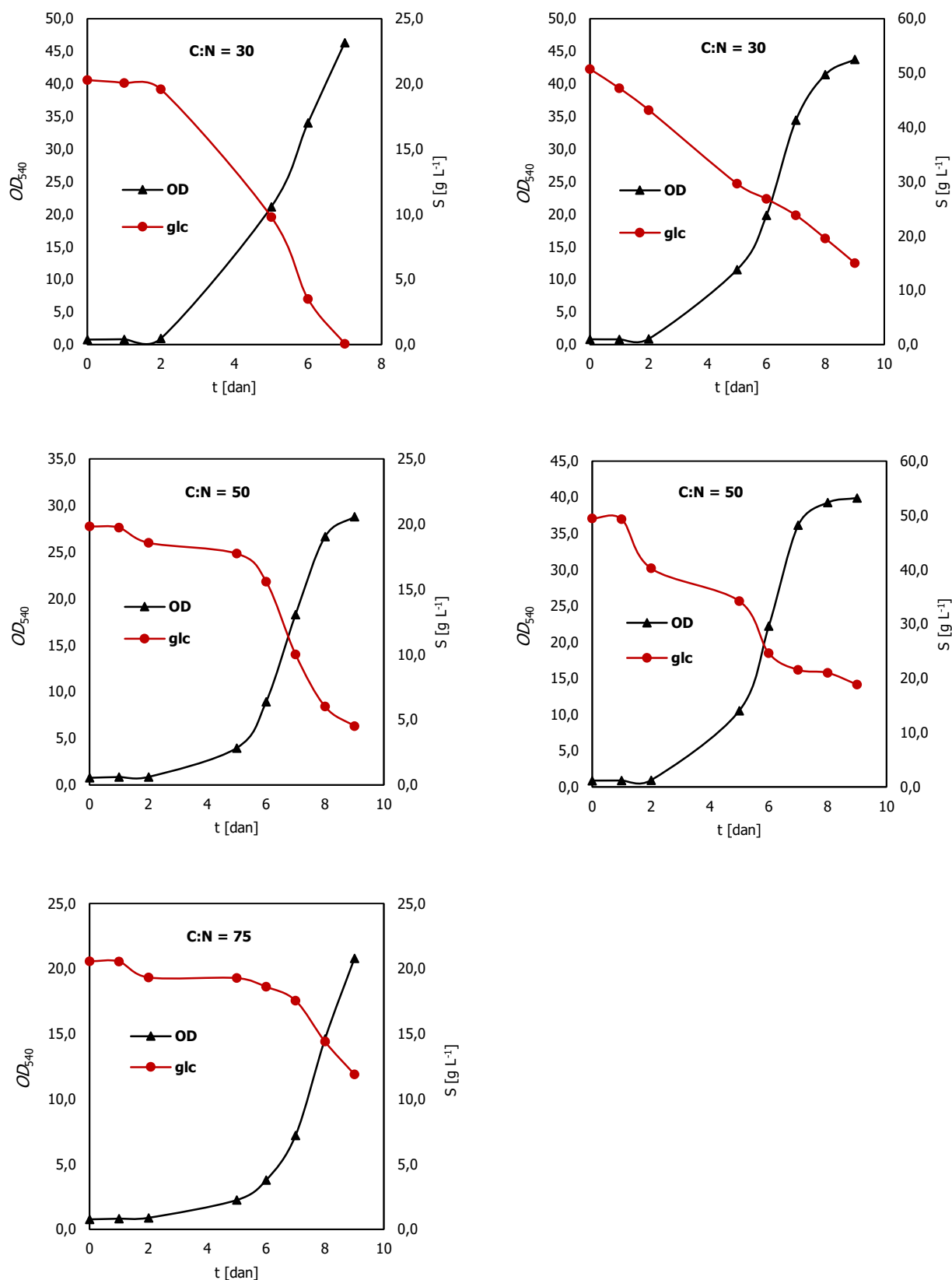
Na slikama 15 i 16 prikazana je promjena udjela rezervnih makromolekula s porastom molarnog C:N omjera. Kod obje vrste kultivacije uočen je porast udjela lipida u biomasi kod većih C:N omjera. To je u skladu s opće prihvaćenim zapažanjem da koncentracija izvora dušika značajno utječe na biosintezu lipida. Međutim, očigledno je da isto pravilo ne vrijedi za ugljikohidrate. Heterotrofna kultivacija pogodovala je pohrani ugljikohidrata najvjerojatnije u formi škroba, s obzirom da je već prethodno spomenuta njegova zastupljenost u biomasi zelenih mikroalgi. Ovu pretpostavku potkrepljuje činjenica da glavninu hidrolizata mikroalgi čini glukoza (Slika 16).

#### 4.3.2. Miksotrofni uzgoj pri različitim C:N omjerima

Svrha ovog eksperimenta bila je proučavanje utjecaja šireg raspona C:N omjera tijekom miksotrofne kultivacije *C. vulgaris* na rast i biosintezu najvažnijih proizvoda mikroalgi. Kao što je prethodno navedeno, među mnogim čimbenicima koji utječu na rast i nakupljanje vrijednih proizvoda spominje se i temperatura. Stoga je ovaj eksperiment proveden pri višoj temperaturi te je istražen njen učinak. Osim toga, pripremljena BB podloga sadržavala je dvostruku početnu koncentraciju mineralnih soli.

Krivulje rasta prikazane su na slici 17, a pokazatelji uspješnosti u tablici 10. Uočljivo je da se s povećanjem C:N omjera produljuje lag faza rasta. Kod početne koncentracije glukoze od  $20 \text{ g L}^{-1}$  koncentracija biomase na kraju procesa bila je najviša kod omjera C:N 50. Međutim, vrijednost pripadajuće produktivnosti sinteze biomase bila je niža u odnosu na C:N omjer 30. Usporedbom trajanja uzgoja za navedene omjere C:N, uočava se da je brzina potrošnje glukoze kod nižeg omjera C:N značajno veća, sukladno opskrbi većom količinom dušika. Ova pojava još je izraženija kod omjera C:N 75 gdje je uočen znatno sporiji rast i potrošnja supstrata. Eksperimentom u poglavlju 4.2. utvrđeno je da pri  $50 \text{ g L}^{-1}$  glukoze još uvijek ne nastupa značajna inhibicija supstratom. Ostvareni prinosi biomase kod ove su koncentracije glukoze znatno veći. Neočekivano, veći prinos biomase ostvaren je pri većem molarnom omjeru C:N. Kod oba molarna C:N omjera, ulazak kulture u stacionarnu fazu rasta zabilježen je tijekom 8. dana uzgoja, što je vjerojatno posljedica iscrpljivanja dušika iz podloge. Usporedbom prinosa biomase kulture uzgojene pri  $20 \text{ g L}^{-1}$  glukoze kod omjera C:N 30 s prethodnim eksperimentom, primjetan je pojačan rast kulture, na što je utjecala viša temperatura ili dvostruka koncentracija soli odnosno oba čimbenika istovremeno.



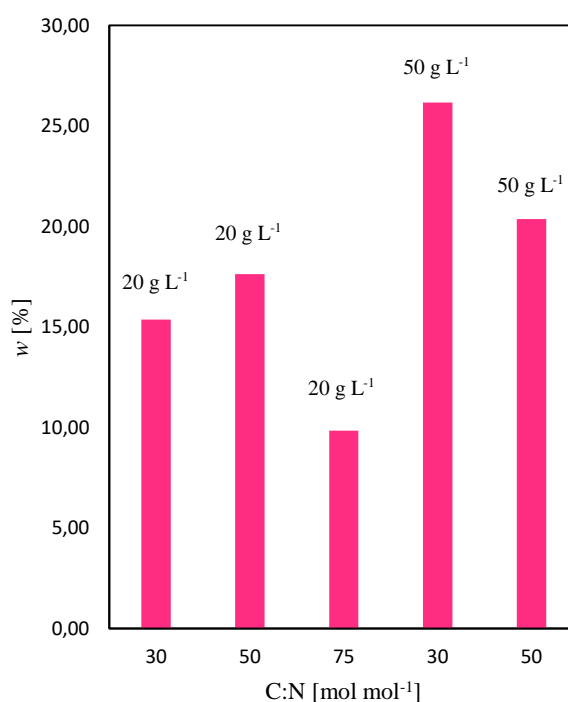


**Slika 17.** Krivulje rasta i utroška supstrata pri različitim početnim koncentracijama glukoze i molarnim omjerima C:N.

**Tablica 10.** Pokazatelji uspješnosti biosinteze biomase tijekom šaržnog miksotrofnog uzgoja u tikvicama.

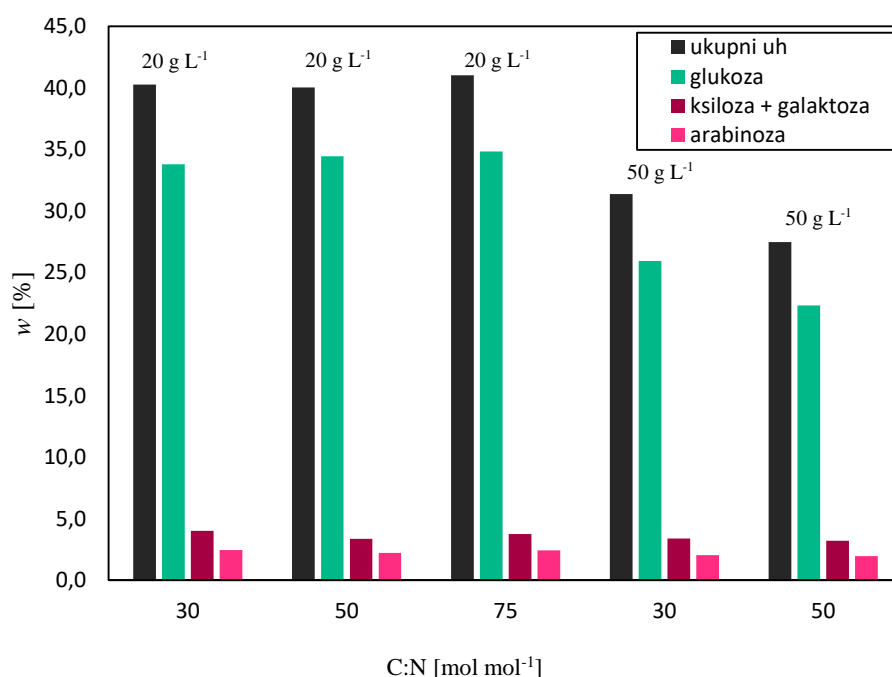
C:N [mol mol <sup>-1</sup> ]	X [g L <sup>-1</sup> ]	Y <sub>X/S</sub> [g g <sup>-1</sup> ]	Pr [g L <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> ]
20 g/L			
30	10,1	0,499	1,4429
50	12,515	0,8175	1,3906
75	6,84	0,7886	0,76
50 g/L			
30	14,49	0,4057	1,61
50	20,14	0,6582	2,2378

Poznato je da viši omjeri C:N pogoduju nakupljanju lipida (Ikaran i sur., 2015). Međutim, povećanje C:N omjera prema rezultatima nije uvijek bilo u skladu s navedenim principom (Slika 18). Značajno manji sadržaj lipida kod omjera C:N 75 u korelaciji je s visokom koncentracijom rezidualne glukoze u podlozi po završetku uzgoja, stoga nizak udio lipida u biomasi u ovom slučaju ne iznenađuje. Niži sadržaj lipida kod omjera C:N 50 pri 50 g L<sup>-1</sup> glukoze moguće je objasniti neučinkovitošću metode ekstrakcije. Naime, u literaturi se spominje manje iskorištenje ekstrakcije ukoliko je za radni mikroorganizam karakterističan značajan sadržaj membranski vezanih lipida (Dickey i sur., 2001).

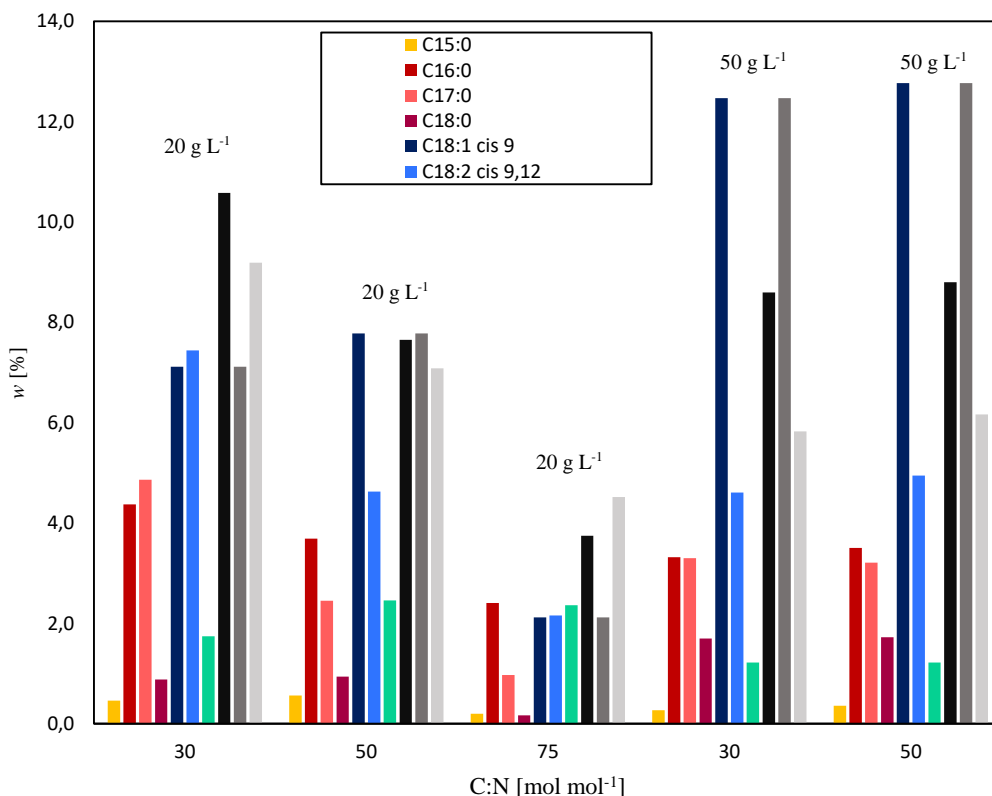


**Slika 18.** Promjena udjela lipida tijekom miksotrofne kultivacije pri različitim C:N omjerima i koncentracijama glukoze.

Poznato je da zelene mikroalge nakupljaju lipide u određenim stresnim uvjetima, međutim favoriziraju pohranu ugljika i energije u formi ugljikohidrata (Cheng i sur., 2017). To je moguće opaziti na slici 19, budući da je zabilježen veći udio ugljikohidrata u biomasi *C. vulgaris*. Usporedbom dobivenih udjela ukupnih lipida i ugljikohidrata s prethodnim eksperimentom kod omjera C:N 30 i početne koncentracije glukoze  $20 \text{ g L}^{-1}$  može se zaključiti da je njihova suma u oba slučaja podjednaka. Međutim, raspodjela ugljika između dvije vrste rezervnih makromolekula značajno se razlikovala. U uvjetima povišene koncentracije anorganskih soli i temperature, stanice su akumulirale prvenstveno ugljikohidrate. Osim navedenog, usporedbom rezultata na slikama 18 i 19 uočava se da i koncentracija glukoze u podlozi utječe na konačan omjer udjela lipida i ugljikohidrata u biomasi. Vidljivo je da su za istu ispitivanu koncentraciju glukoze udjeli ugljikohidrata gotovo podjednaki, suprotno tvrdnji da viši omjeri C:N pospješuju akumulaciju ugljikohidrata (Ikaran i sur., 2015). Pozitivan učinak povećanja temperature i osmotskog pritiska na rast i akumulaciju ugljikohidrata spominje se i u literaturi (Markou i sur., 2012). Ipak, valja voditi računa o rasponu vrijednosti temperature koji omogućuje nesmetan rast kulture.



**Slika 19.** Promjena udjela ugljikohidrata tijekom miksotrofne kultivacije pri različitim omjerima C:N i koncentracijama glukoze.



**Slika 20.** Profil masnih kiselina tijekom miksotrofne kultivacije pri različitim omjerima C:N i koncentracijama glukoze.

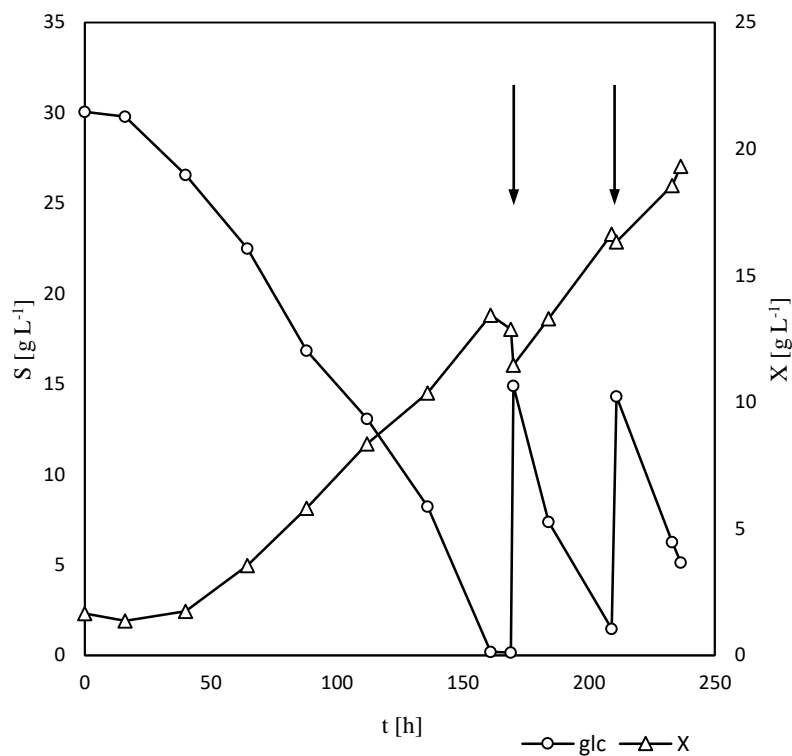
Istraživanja su pokazala da prinos masnih kiselina, za većinu vrsta, ovisi o brojnim okolišnim čimbenicima, primjerice temperaturi, koncentraciji izvora dušika, intenzitetu svjetlosti itd. (Chen i Johns, 1991). Na slici 20 može se uočiti da profil masnih kiselina značajno ovisi o koncentraciji glukoze i natrijevog nitrata. Ipak, očigledno je da su u najvećoj mjeri kod svih ispitivanih omjera C:N zastupljene oleinska (C18:1 cis 9) i linolna (C18:2 cis 9,12) kiselina. Porast udjela oleinske kiseline u ukupnim metilnim esterima masnih kiselina s povećanjem omjera C:N zabilježen je i u literaturi (Cho i sur., 2011). Osim prikazanih masnih kiselina, biomasa je u pojedinim slučajevima sadržavala neznatne količine C14:0, C14:1 cis 9, C15:1 cis 10 i C16:1 cis 9 čija ukupna suma nije prelazila 3 %. Valja zamijetiti da koncentracija izvora ugljika ima značajan utjecaj na omjer zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina. Tako omjer zasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina u biomasi uzgojenoj pri 20 g L<sup>-1</sup> glukoze uz omjer C:N 30 bio gotovo podjednak, dok je za isti molarni omjer pri 50 g L<sup>-1</sup> glukoze biomasa u većoj mjeri sadržavala jednostruko nezasićene masne kiseline. Ova pojava zamijećena je i kod istraživanja utjecaja različitih koncentracija glukoze na druge vrste mikroalgi (Mitra i Mishra, 2018).

#### 4.4. ŠARŽNI UZGOJ S PRITOKOM SUPSTRATA

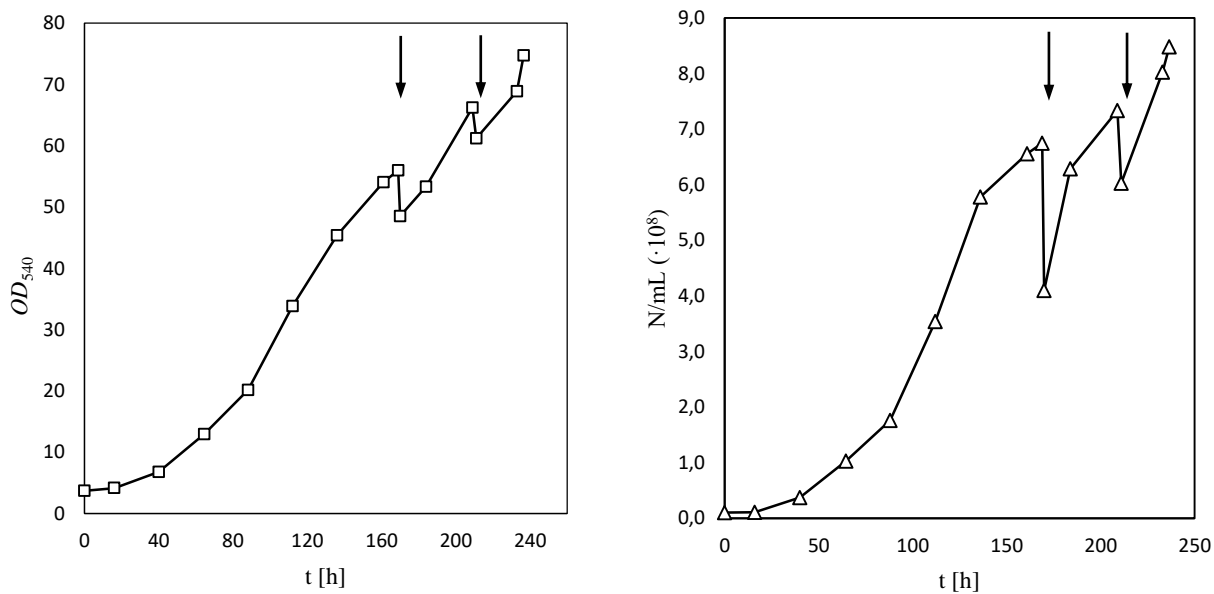
S tehnološkog aspekta, heterotrofna kultivacija mikroalgi jednostavnija je od fotoautotrofne zahvaljujući mogućnosti uzgoja u konvencionalnim bioreaktorskim sustavima, čime se eliminira potreba za svjetlosnom energijom, a ujedno omogućuje postizanje znatno viših koncentracija biomase te posljedično značajnijih količina vrijednih proizvoda. Na temelju rezultata prethodnog eksperimenta odabran je omjer C:N kod kojeg je postignut najveći prinos biomase. Cilj uzgoja u bioreaktoru bio je postizanje visoke koncentracije biomase u šaržnom dijelu bioprocesa nakon čega je uslijedila faza limitacije izvorom dušika u svrhu poticanja akumulacije lipida. Naime, obilne početne količine dušika u podlozi pospješuju rast stanica, s obzirom da je dušik sastavni element proteina, nukleinskih kiselina i nukleotidnih koenzima. Njegovo iscrpljivanje iz podloge uzrokuje pad brzine rasta i potiče značajne promjene koje se u stanicama mikroalgi i drugih oleaginoznih mikroorganizama očituju u nakupljanju triacilglicerola kao što je opisano u poglavlju 2.3.2.

Uzgoj je ukupno vođen 236 h. Optička gustoća kulture (Slika 22) bila je okvirni pokazatelj trenda rasta stanica, dok je precizniji pokazatelj rasta bila koncentracija biomase određena gravimetrijski (Slika 21). Koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila je 19,32 g L<sup>-1</sup>. Ukupna produktivnost sinteze biomase iznosila je 0,0747 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, dok je koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio 0,3667 g g<sup>-1</sup>. Izračunata produktivnost gotovo je deset puta viša u usporedbi s literaturom (Stephenson i sur., 2010). Specifična brzina rasta određena je za svaku karakterističnu točku uzgoja: na kraju šaržnog dijela procesa iznosila je 0,0182 h<sup>-1</sup>, između prve i druge prihrane 0,0096 h<sup>-1</sup>, odnosno 0,0064 h<sup>-1</sup> nakon druge prihrane. Analogno, generacijsko vrijeme za karakteristične točke uzgoja bilo je 23,79 h, 46,42 h, odnosno 51,76 h.

Općenito se smatra da bioreaktori s miješalom nisu pogodni za kultivaciju mikroalgi s obzirom na osjetljivost stanica na smična naprezanja, posebice na krajevima lopatica (Wang i Lan, 2018). Ova pojava u manjoj je mjeri bila izražena tijekom ovog uzgoja. Naime, uočeno je povećanje intenziteta zelenog obojenja supernatanta, koje je posebice bilo izraženo pri kraju eksponencijalne faze. Dodatni doprinos tome je prirodni porast brzine odumiranja pri ulasku kulture u stacionarnu fazu rasta.



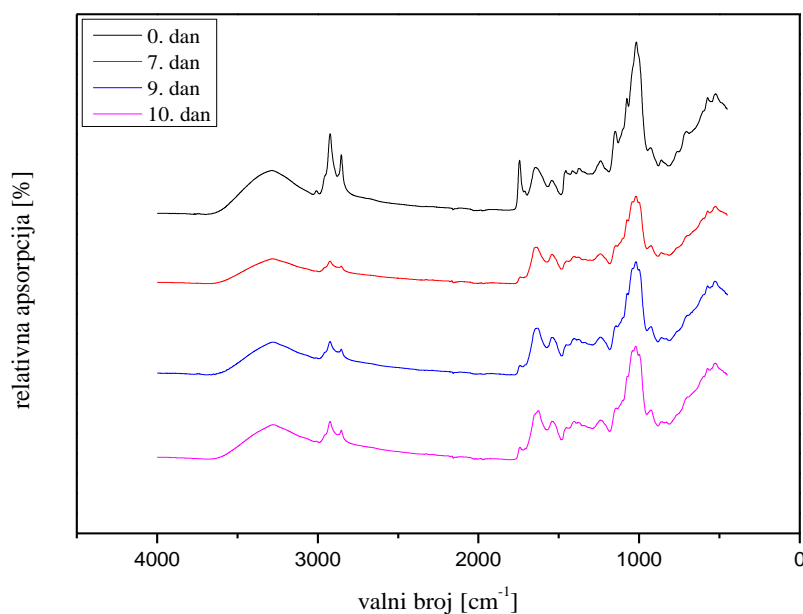
**Slika 21.** Promjena koncentracije biomase i glukoze tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata. (Strelice označavaju prihranu).



**Slika 22.** Promjena optičke gustoće (a) i broja stanica (b) tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

## 4.4.1. Sastav biomase

Poznato je da uvjeti kultivacije poput temperature, pH, dostupnosti svjetla i koncentracije nutrijenata znatno utječu na sastav biomase. Ugljikohidrati, lipidi i proteini su najzastupljenije makromolekule u biomasi mikroalgi, stoga je tijekom uzgoja praćena promjena njihovog udjela. Osim navedenog, praćen je udio pigmenata te profil masnih kiselina. Sadržaj pepela u biomasi određen je za posljednji dan uzgoja te je iznosio 4 %. U daljnjem tekstu moguće je zamijetiti da se ukupni udio analiziranih molekulskih komponenata stanice tijekom uzgoja smanjuje. Uz pretpostavku da je udio pepela u stanicama konstantan, ukupne analizirane makromolekule činile su 78,92 % suhe tvari biomase *C. vulgaris* na početku uzgoja, dok je u konačnici njihova vrijednost pala za 20 %. Od ostalih komponenata biomase, čija količina nije određena analizom, udjelom bi najzastupljenije trebale biti nukleinske kiseline, međutim njihov udio ne prelazi 10 % (Finkel i sur., 2016). S obzirom na pretpostavku neučinkovite ekstrakcije proteina, moguće je zaključiti da njihov udio ima značajan utjecaj na ukupnu sumu. Problematika ekstrakcije intracelularnih proteina zelenih mikroalgi otprije je poznata te je u korelaciji s rigidnošću njihovih staničnih stijenki (Barkia i sur., 2019) Ovdje je još važno uzeti u obzir kumulativne pogreške tijekom ekstrakcije i analize pojedinih molekulskih vrsta.



**Slika 23.** FT-IR spektri biomase *C. vulgaris* tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

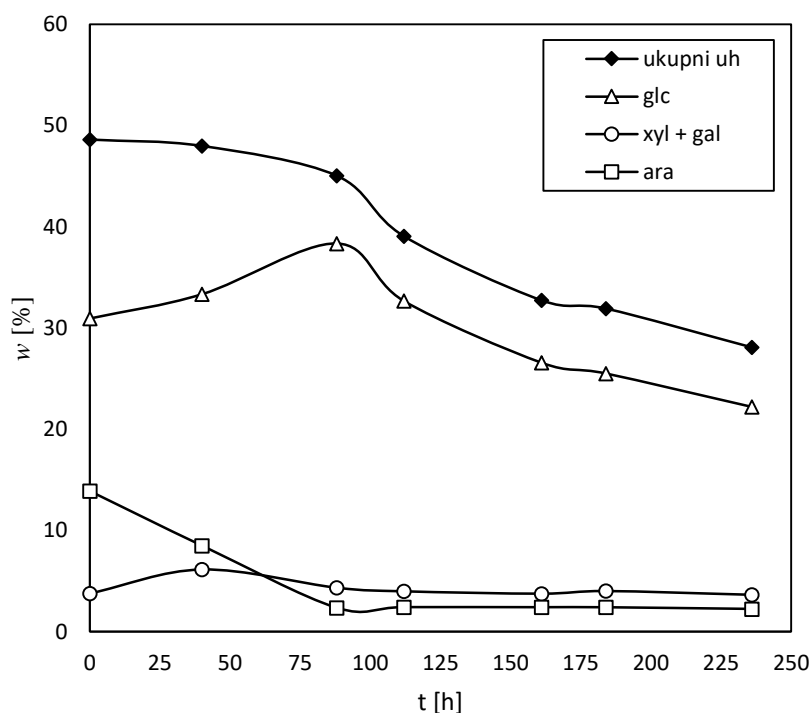
Na slici 23. prikazani su FT-IR spektri biomase *C. vulgaris* za nekoliko karakterističnih točaka tijekom uzgoja. Najpouzdaniji signal za detekciju lipida u biomasi je apsorpcijski maksimum istezanja esterske veze karakteristične za lipide pri  $1745\text{ cm}^{-1}$ . Za proteine su karakteristična dva pika s apsorpcijskim maksimumima pri  $1545$  i  $1655\text{ cm}^{-1}$ . Ugljikohidrati mikroalgi predstavljaju složenu skupinu dugolančanih razgranatih strukturnih polisaharida kao i zaliha rezervnih ugljikohidrata poput škroba (Mayers i sur., 2013). To je vidljivo prema složenom preklapanju signala na spektrima u području između  $900$  i  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.4.1.1. Ugljikohidrati

Mikroalge su u stanju akumulirati visoke količine ugljikohidrata putem fotosinteze. Stoga ne iznenađuje činjenica da je udio ugljikohidrata u biomasi na početku uzgoja bio najveći, budući da je bioreaktor inokuliran miksotrofno uzgojenom kulturom. Poznato je da se u stanicama zelenih mikroalgi ugljikohidrati akumuliraju u formi škroba. To potvrđuje visok udio glukoze u ukupnim ugljikohidratima. Nakupljanje ugljikohidrata obično se događa u stresnim uvjetima, prvenstveno uz limitaciju rasta stanice izvorom dušika. Suprotno literaturi, iscrpljivanje dušika iz podloge uzrokovalo je pad udjela ugljikohidrata (Slika 24).

Udio ukupnih ugljikohidrata se tijekom uzgoja smanjio s početnih 48,61 na 28,1%. Ovu pojavu moguće je objasniti nedostatnom količinom glukoze u prihrani. Naime, koncentracija stanica u bioreaktoru u trenutku prihrane bila je visoka. S obzirom da su obilne količine izvora ugljika u podlozi preduvjet za akumulaciju ugljikohidrata i lipida, to nije moglo biti osigurano, budući da su stanice vrlo brzo asimilirale glukozu u svrhu vlastitog održavanja. Prikladna bi bila još jedna prihrana isključivo obilnom količinom glukoze u svrhu poticanja nakupljanja željenih makromolekula. Osim pohrane u formi škroba, ugljikohidrati su važne komponente stanične stijenke zelenih mikroalgi. Osnovni polimer pritom je celuloza, međutim mogu sadržavati manje udjele pentoza (Ho i sur., 2013). Njihovi su udjeli, u usporedbi s glukozom, u staničnom hidrolizatu zanemarivi.



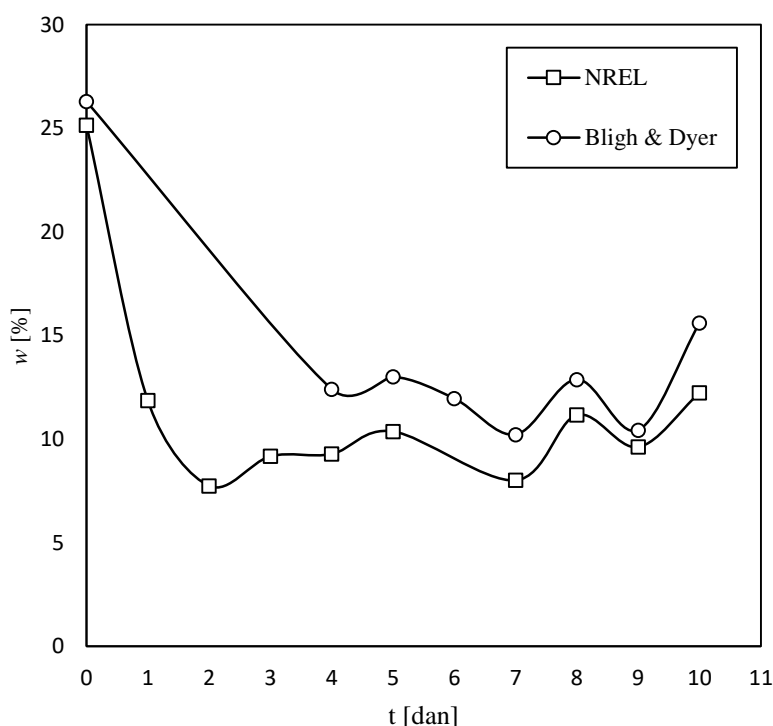


**Slika 24.** Promjena udjela ugljikohidrata u biomasi *C. vulgaris* tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

#### 4.4.1.2. Lipidi

Oleaginozne mikroalge imaju sposobnost nakupljanja značajnih količina lipida u staničnoj biomasi. *Chlorella vulgaris* također pripada ovoj skupini (Pal i sur., 2019). Promjena udjela lipida prikazana je na slici 25. Uzgojem u bioreaktoru također je potvrđen princip da su promjene udjela rezervnih makromolekula posljedica promjene koncentracije dušika u podlozi. Naime, vidljivo je da se udio lipida značajno smanjuje prije, a raste nakon prihrane. Razlog tome je opskrba izvorom ugljika koji je nužan za sintezu lipida (Mitra i sur., 2012). Međutim, kao što je ranije navedeno, opskrba ugljikom u podlozi bila je nedostatna za intenzivniju akumulaciju lipida. Ubrzo nakon prihrane, zalihe lipida, a i ugljikohidrata kao što je navedeno u prethodnom poglavlju, su se ponovo počele trošiti s obzirom na potrebe brzo rastuće kulture za energijom nužnom za diobu stanica (kultura je održavana u eksponencijalnoj fazi rasta). Konačna koncentracija lipida u bioreaktoru iznosila je  $3,01 \text{ g L}^{-1}$ . Paes i sur. (2016) miksotrofnim šaržnim uzgojem s pritokom supstrata *Chlorella* sp. postigli su jednak udio lipida u biomasi iako je kultura održavana u uvjetima limitacije dušikom kroz posljednjih 6 dana uzgoja. Također, ekvivalentan sadržaj lipida tijekom šaržne kultivacije slatkovodne mikroalge *Chlorella* sp. uočili su Cheirsilp i Torpee (2012). Na slici 25 prikazana je i usporedba dviju korištenih metode ekstrakcije. Moguće je uočiti da je trend promjene udjela lipida gotovo

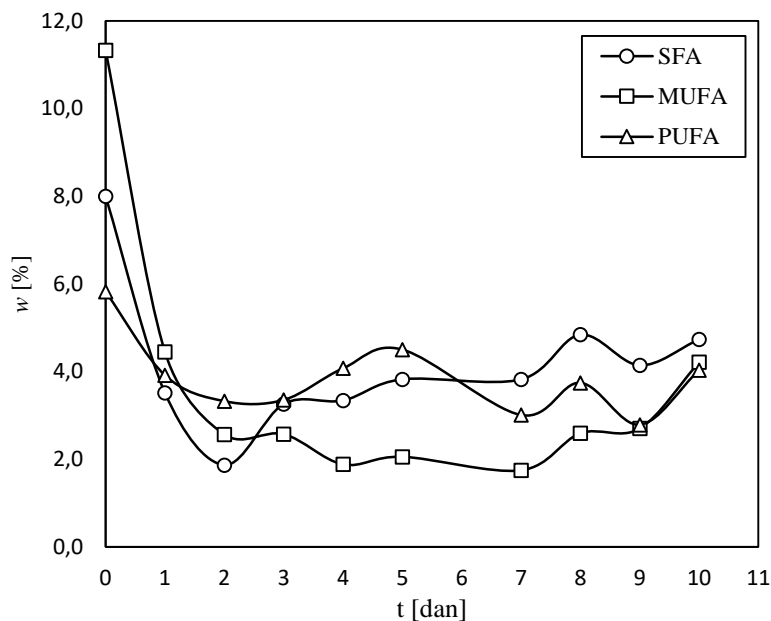
identičan. NREL metodom je potvrđeno da je Bligh & Dyer ekstrakcija uspješno provedena. Međutim, moguće je uočiti odstupanje između udjela lipida određenih ovim metodama. To se može objasniti zaostajanjem pigmenata i ostalih nečistoća u kloroformskoj fazi tijekom Bligh & Dyer ekstrakcije. Također valja uzeti u obzir da je NREL metodom određen udio ukupnih metilnih estera masnih kiselina u uzorcima, te je glicerol zaostao u polarnoj metanolnoj fazi. Slična pojava uočena je prilikom ekstrakcije lipida u drugim biološkim uzorcima (Dickey i sur., 2001). Chen i Johns (1991) proučavali su učinak aeracije na nakupljanje lipida u biomasi mikroalge *Chlorella sorokiniana* te su uočili negativan učinak na udio ukupnih lipida s porastom aeracije. Pretpostavlja se da porast aeracije dovodi do pojačanog katabolizma lipida u stanicama te se ta činjenica može smatrati mogućim razlogom relativno niskog sadržaja lipida u biomasi *Chlorella vulgaris* u ovom slučaju.



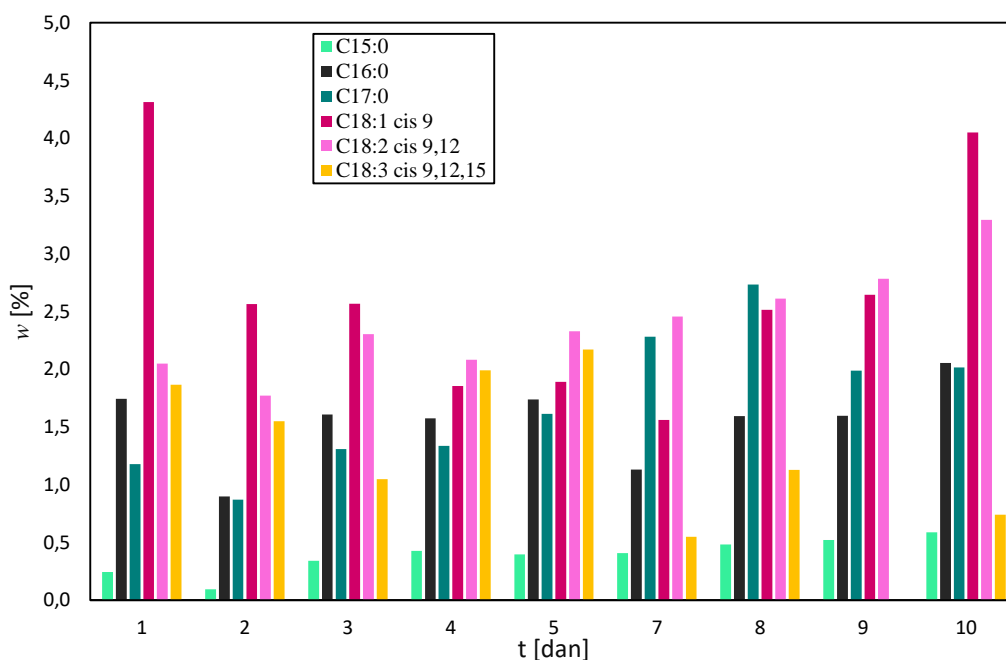
**Slika 25.** Promjena udjela lipida u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Na slici 26 prikazana je promjena udjela zasićenih (SFA), jednostruko nezasićenih (MUFA) i višestruko nezasićenih (PUFA) masnih kiselina tijekom uzgoja. Visok sadržaj svih masnih kiselina u prvim satima uzgoja jasan je pokazatelj da je u miksotrofno uzgojenom inokulumu njihov udio značajno viši. Nakon početne lag faze, udio zasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina se postepeno povećavao, dok se udio jednostruko nezasićenih

kiselina smanjio. Porast višestruko nezasićenih masnih kiselina zabilježen je prije prve prihrane.



**Slika 26.** Promjena udjela SFA, MUFA i PUFA u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.



**Slika 27.** Promjena udjela masnih kiselina u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Na slici 27 prikazana je promjena udjela najzastupljenijih masnih kiselina u biomasi *C. vulgaris* tijekom heterotrofnog uzgoja s pritokom supstrata. Kompozicija masnih kiselina određuje njihovu primjenu u terapijske svrhe, odnosno za proizvodnju biodizela. Prikazane

masne kiseline čine više od 95 % ukupnih izoliranih metilnih estera. U neznatnim količinama bile su prisutne i sljedeće masne kiseline: C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C14:1 cis 9, C15:1 cis 10, C16:1 cis 10, C18:0, C24:0 te C24:1 cis 15. Moguće je zamijetiti da je oleinska kiselina (C18:1 cis 9) udjelom najzastupljenija masna kiselina u biomasi ove mikroalge. Međutim, jasno je da profil udjela pojedinih masnih kiselina značajno ovisi o načinu i uvjetima uzgoja, posebice dostupnosti pojedinih nutrijenata. U prvim danima uzgoja, odnosno uvjetima dostupnosti dušika dominiraju oleinska, linolna (C18:2 cis 9,12) i  $\alpha$ -linolenska (C18:3 cis 9,12,15). U poglavlju 2.3.2. spomenuta je važnost stearinske kiseline (C18:0) u biosintezi dugolančanih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Njen neznatan udio u biomasi upućuje na intenzivnu konverziju u nezasićene masne kiseline s 18 C-atoma. Udio palmitinske kiseline (C16:0) nije se značajno mijenjao tijekom uzgoja što je u skladu s literaturom (Stephenson i sur., 2010). Slično je i s pentadekanskom kiselinom (C15:0) čiji udio tijekom uzgoja nije prelazio 0,6 %. U uvjetima limitacije dušikom tijekom posljednja tri dana uzgoja prevladavale su oleinska i linolna kiselina, pri čemu je udio linolne kiseline značajno porastao u odnosu na početak uzgoja. Ovdje se može uočiti i značajan porast udjela margarinske kiseline (C17:0). Valja zamijetiti da to nije slučaj s  $\alpha$ -linolenskom kiselinom čija se sinteza znatno smanjila u uvjetima limitacije dušikom na kraju uzgoja sukladno literaturi (Wang i sur., 2017), međutim u kasnoj eksponencijalnoj fazi je dosegla maksimalne vrijednosti.

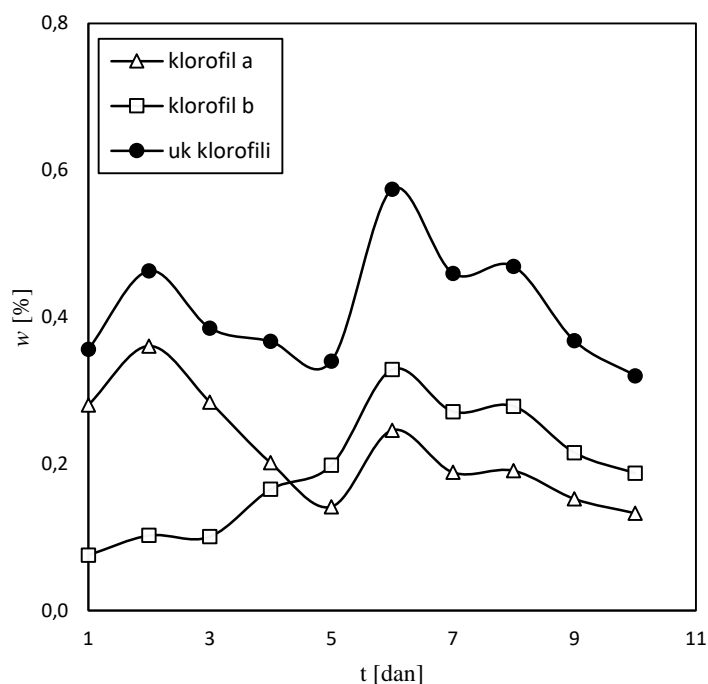
#### 4.4.1.3. Proteini

Proteini ekstrahirani iz biomase mikroalgi prema modificiranoj metodi Slocombe i sur. (poglavlje 3.2.7.10.) određeni su metodom po Bradfordu. Uočeno je da se njihov sadržaj tijekom uzgoja nije značajnije mijenjao (tablica 11). Tijekom perioda limitacije rasta izvorom dušika očekivano je smanjenje udjela proteina (Mitra i sur., 2012). Međutim, neznatno smanjenje njihovog udjela uočeno je tek u posljednjim satima uzgoja. Mikroalga *C. vulgaris* općenito je poznata po visokom sadržaju proteina u biomasi, koji u uvjetima optimalne opskrbe nutrijentima iznosi oko 60%, dok se u uvjetima limitacije dušikom udio smanjuje do 20 % (Ho i sur., 2013; Ikaran i sur., 2015). Budući da su vrijednosti udjela proteina postignutih tijekom ovog uzgoja značajno niže od vrijednosti prikazanih u literaturi, valja uzeti u obzir efikasnost ekstrakcije, odnosno eventualne gubitke u pojedinim koracima ekstrakcije. Osim navedene metode, provedena je alkalna hidroliza biomase nakon koje je uslijedilo određivanje koncentracije proteina metodom po Lowryju. Rezultati su prikazani u prilogu 7.5. Iznimno niski udjeli proteina u staničnim hidrolizatima upućuju na potencijalnu interferenciju nekih od komponenata biomase. Ista pojava uočena je i komentirana u radu Komušar (2019).

**Tablica 11.** Udio proteina u biomasi *C. vulgaris* tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata

t [dan]	udio u biomasi [%]
0	6,75
7	10,07
9	10,57
10	9,88

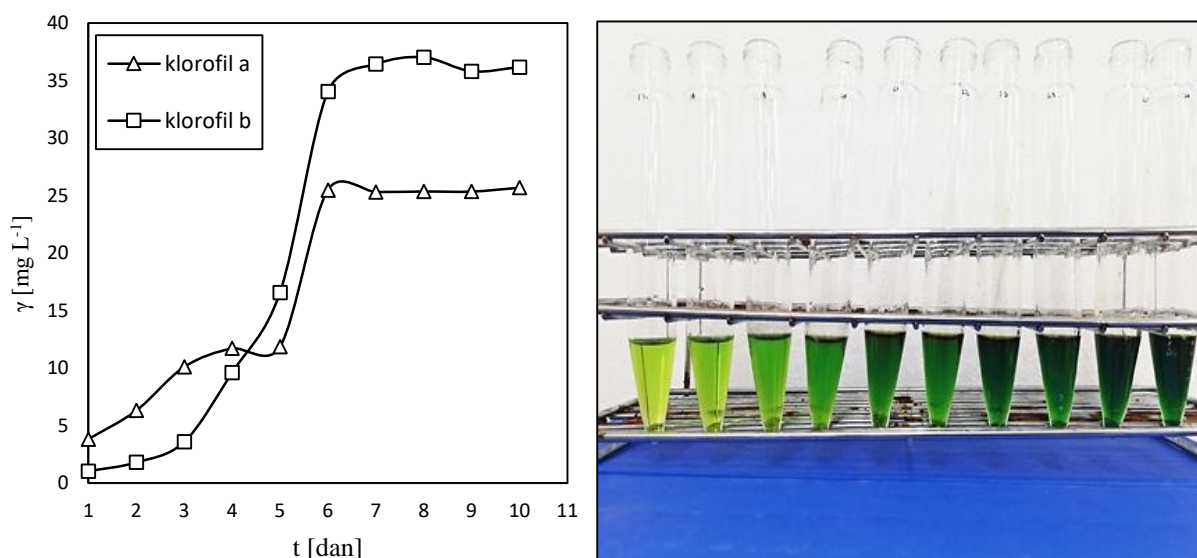
#### 4.4.1.4. Pigmenti

**Slika 28.** Promjena udjela klorofila *a* i *b* u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata.

Klorofil predstavlja komponentu bogatu dušikom, koja služi kao svojevrsna intracelularna zaliha dušika te omogućuje daljnji rast i održavanje stanica u uvjetima limitacije izvorom dušika (Benavente-Valdés i sur., 2016). Porast udjela klorofila *a* i *b* implicira asimilaciju izvora dušika iz podloge. Na slici 28 ovaj fenomen jasno se vidi nakon 7. dana uzgoja. Sličan trend zabilježili su Ördög i sur. (2012) prilikom uzgoja mikroalge *Chlorella minutissima*. Druga prihrana dodana je u 9. danu uzgoja, no ona je sadržavala isključivo glukozu te je stoga razumljiv daljnji kontinuiran pad udjela klorofila u biomasi. Ostaje nerazjašnjen porast ukupnih klorofila tijekom 6. dana uzgoja. S obzirom da je komentiran

učinak hidrodinamičkog stresa na rast stanica, posebice pri kraju eksponencijalne faze rasta, ova se pojava može objasniti asimilacijom dušika oslobođenog lizom stanica.

Većina fotosintetskih organizama u stanju je sintetizirati klorofil i u uvjetima limitacije svjetlošću. Ova pojava izostaje kod mnogih koljena čiji je nastanak posljedica sekundarne endosimbioze, što upućuje da je ovom značajnom evolucijskom događaju prethodio gubitak gena za sintezu u mraku. Enzim s ključnom ulogom u sintezi klorofila u mraku je protoklorofilid oksidoreduktaza neovisna o svjetlosti (Gálová i sur., 2008). Ovaj enzim katalizira stereo-specifičnu redukciju u molekulama protoklorofilida, a nastali klorofilid se brzo konvertira u klorofil *a*. Klorofil *b* nastaje oksidacijom metilne grupe na 7. C-atomu klorinskog prstena prekursora klorofila *a* pomoću klorofilid *a* oksigenaze (Armstrong, 1998). To objašnjava pad udjela klorofila *a* uz istovremeni rast udjela klorofila *b* u šaržnom dijelu uzgoja. Ekspresija klorofilid *a* oksigenaze visoko je regulirana intenzitetom svjetlosti (Biswal i sur., 2012). Poznato je da zelene alge i biljke u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti favoriziraju sintezu klorofila *b*. Klorofil *b* se smatra pomoćnim pigmentom u fotosintetskim organizmima. Njegova je osnovna funkcija prikupljanje i prijenos svjetlosne energije prema klorofilu *a*.



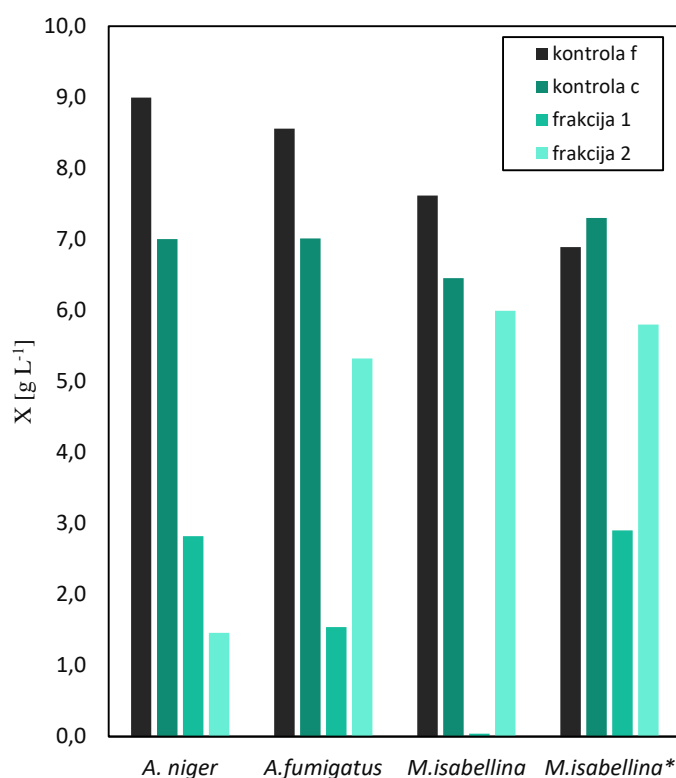
**Slika 29.** Promjena koncentracije klorofila *a* i *b* tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata

Interkonverzija između klorofila *a* i *b* algama nudi mogućnost adaptacije na različite intenzitete svjetlosti. Ipak, fiziološko značenje zadržavanja ovih pigmenata tijekom heterotrofne kultivacije i dalje je nepoznato. Smanjenje omjera klorofila *a/b* može se pojasniti principima analognim višim biljkama. Naime, u uvjetima limitiranog solarnog zračenja smanjenje omjera *a/b* može se smatrati vrstom adaptacije u svrhu maksimizacije efikasnosti apsorpcije svjetlosti, budući da pomoćni pigmenti proširuju raspon apsorpcije svjetlosti. Na slici 29 prikazana je

promjena koncentracije pojedinog klorofila u ekstraktu. Omjer  $a/b$  je tijekom posljednjih 5 dana uzgoja bio konstantan i iznosio je 0,7. Nagli porast udjela ukupnih klorofila u *C. vulgaris* uočili su i Doucha i Lívanský (2012) pri iscrpljivanju glukoze iz podloge.

#### 4.5. UZGOJ MJEŠOVITE KULTURE

Miksotrofni uzgoj mješovite kulture pri omjeru C:N 30 mikroalge *Chlorella vulgaris* proveden je u svrhu istraživanja mogućnosti bioflokulacije potpomognute plijesnima *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, odnosno *Mortierella isabellina*. Na slici 30 prikazana je koncentracija biomase na kraju uzgoja za kontrole, odnosno mješovite kulture. Po završetku uzgoja, mješovita kultura razdvojena je na dvije frakcije - peleti plijesni s adsorbiranim stanicama mikroalgi zaostali na filteru čine frakciju 1, dok neadsorbirane stanice mikroalgi iz filtrata predstavljaju frakciju 2.



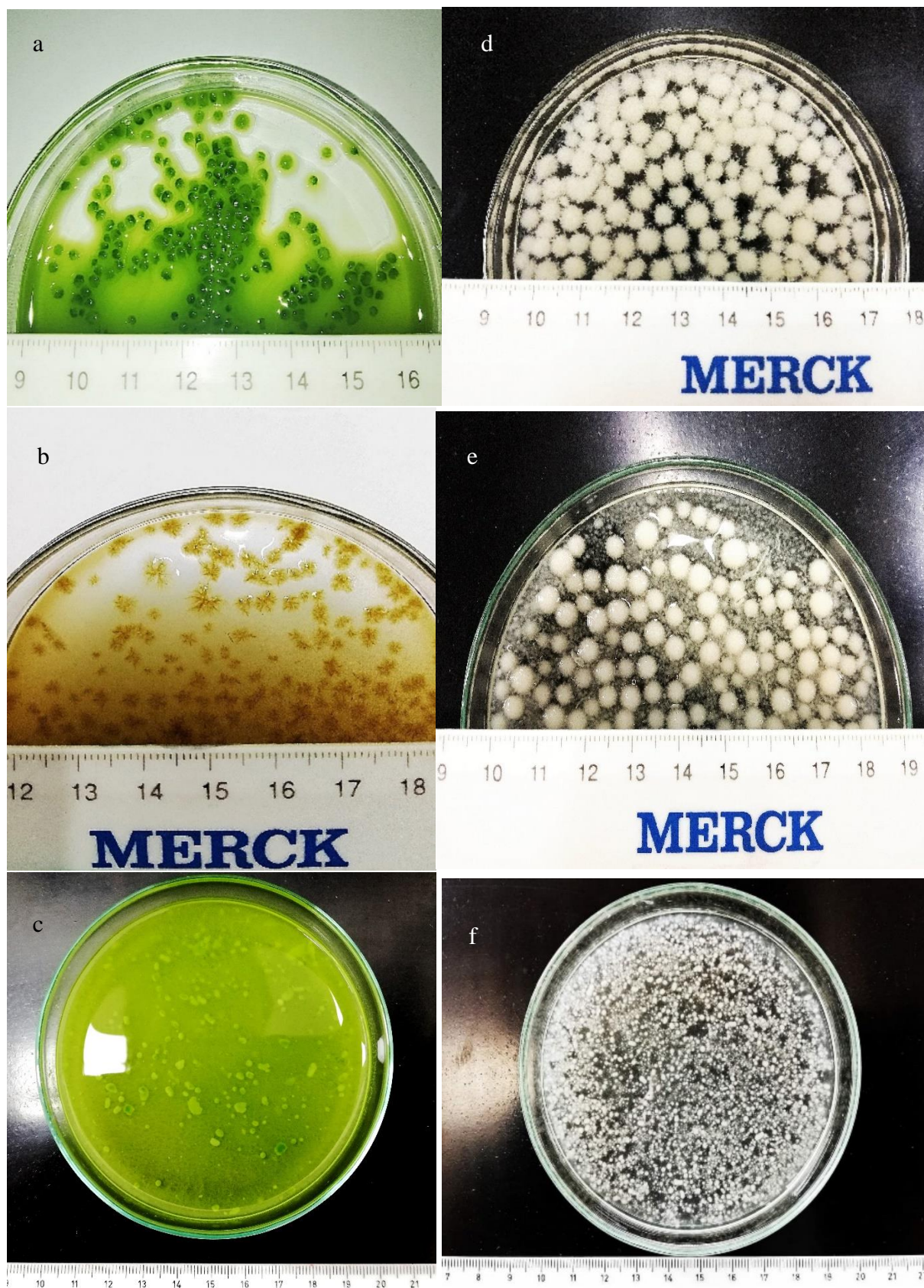
**Slika 30.** Koncentracija biomase na kraju uzgoja. *kontrola f* čista kultura plijesni, *kontrola c* čista kultura *C. vulgaris*, *frakcija 1* biomasa u filtracijskom kolaču, *frakcija 2* biomasa u filtratu.

Inokulacijom čiste kulture nastojalo se postići određenu prednost stanica mikroalgi i omogućiti njihov ulazak u eksponencijalnu fazu rasta, uzimajući u obzir znatno veću specifičnu brzinu rasta plijesni. Tijekom prethodnih eksperimenata utvrđeno je da lag faza kod *C. vulgaris* traje minimalno 1 dan. Kod plijesni *M. isabellina* testirana je i istovremena inokulacija spora i stanica mikroalgi u omjeru 1:2700, s obzirom da je ovoj plijesni svojstven sporiji rast (na slikama prikazana kao *M. isabellina*<sup>\*</sup>). Prilikom rasta dvaju mikroorganizama u zajednici prisutna je supstratna kompeticija, naročito tijekom heterotrofnog uzgoja. Ukoliko je rast mikroalge i plijesni usklađen, ne dolazi do postizanja maksimalnog prinosa biomase ni jednog partnera, u usporedbi s rastom čistih kultura (Gultom i Hu, 2013). Ova činjenica jasno je vidljiva na slici 30, s obzirom na slabiji rast biomase u mješovitoj kulturi. Iznimka je mješovita kultura mikroalge i plijesni *M. isabellina*<sup>\*</sup> gdje je suma koncentracija dobivenih frakcija bila veća u odnosu na čiste kulture. Razlika u koncentracijama frakcija 1 za dvije strategije uzgoja mješovite kulture mikroalge i plijesni *M. isabellina* dobar je primjer učinka početnog omjera stanica mikroalgi i spora plijesni na konačnu kompoziciju kulture. Očigledno je značajno veća koncentracija stanica mikroalgi u mješovitoj kulturi *M. isabellina* bila presudna za rast plijesni koji je u konačnici gotovo u potpunosti izostao. Ipak, vidljivo je da je pri danim uvjetima uzgoja učinkovitost adsorpcije stanica u svim testiranim kulturama relativno niska.

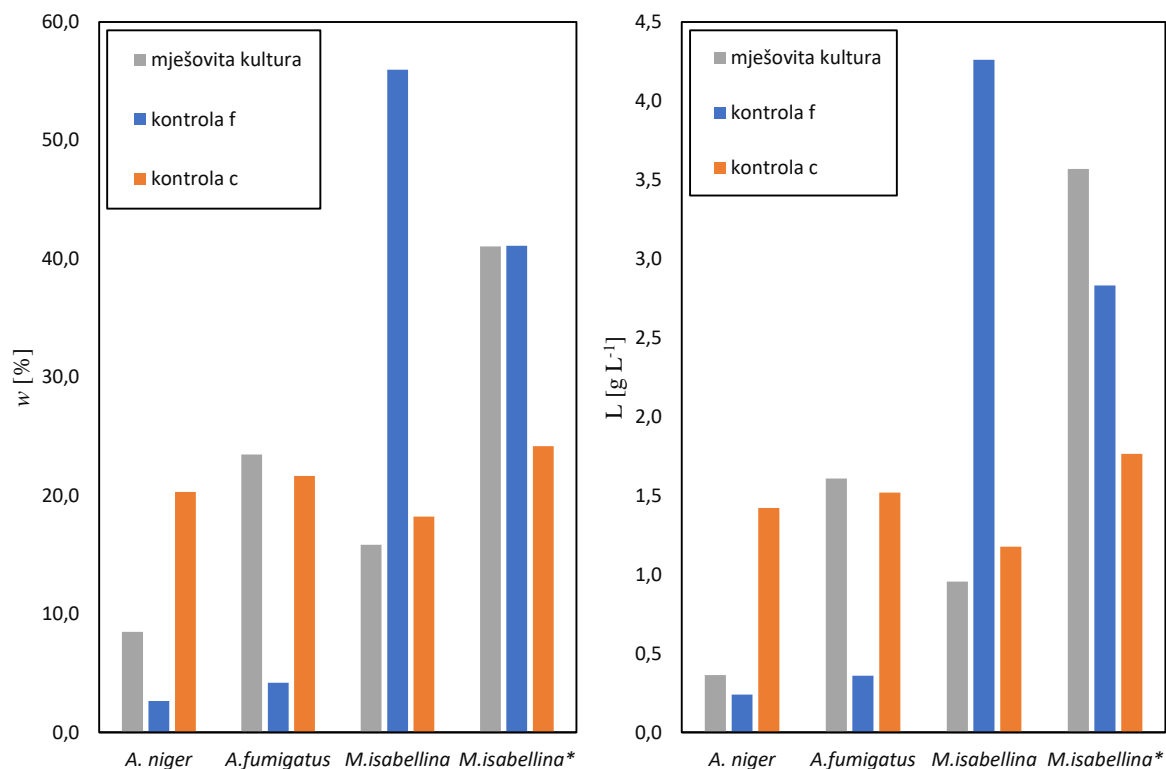
Na slici 31. prikazan je izgled mješovite kulture *C. vulgaris* i tri ispitivana soja plijesni. Peleti plijesni *A. Fumigatus* i *M. isabellina*<sup>\*</sup> poprimili su zelenu boju što ukazuje na vezanje mikroalge s hifama plijesni. Međutim, valja uočiti velik broj stanica mikroalgi zaostalih u suspenziji. Morfologija nastalih peleta značajno se razlikovala. Prosječni promjer peleta *A. fumigatus* poraslih u mješovitoj kulturi iznosio je 2 mm. Kontrola koja je sadržavala isključivo čistu kulturu navedene plijesi sadržavala je pelete prosječnog promjera 4 mm. Kod ostalih ispitivanih sojeva formirale su se nepravilne flokule. S uzgojem je nastavljeno i nakon potpunog iscrpljivanja glukoze iz podloge. Plijesan *A. niger* rasla je na biomasi mikroalge koju je razgrađivala pomoću celulolitičkih enzima (Kassim, 1982). Budući da se stanična stijenka mikroalge *C. vulgaris* sastoji od celuloze, hidroliza polisaharida je omogućila nastanak slobodnih šećera koji su služili kao supstrat za nastavak rasta plijesni te inducirala asocijaciju hifa i mikroalgi tek nakon iscrpljivanja organskog ugljika iz podloge. S obzirom na sposobnost nakupljanja lipida u biomasi, *A. fumigatus* i *M. isabellina* pripadaju oleaginoznim plijesnima (Du i sur., 2019). To se može uočiti i na slici 32 budući da je udio ukupnih masnih kiselina u biomasi *A. fumigatus* iznosio 23,47%, dok je u biomasi *M. isabellina* vrijednost bila gotovo dvostruka. Poznato je da tvorba kompaktnih peleta nije karakteristična za plijesan *M. isabellina*



(Hu i sur., 2013). To često ovisi o omjeru C:N i vremenu kultivacije. U čistoj kulturi formirali su se peleti prosječnog promjera 1 mm koji su bili postojani tijekom čitavog perioda kultivacije. U mješovitoj kulturi peleti su bili nepravilnog oblika, a raspodjela veličine heterogena, promjera od 0,5 do 5 mm.



**Slika 31.** Izgled ko-kulture po završetku uzgoja (a) *A. fumigatus*, (b) *A. niger*, (c) *M. isabellina*, (d) *A. fumigatus* kontrola, (e) *A. niger* kontrola, (f) *M. isabellina* kontrola.



**Slika 32.** Udio i koncentracija ukupnih masnih kiselina

Na slici 32. prikazane su koncentracije ukupnih metilnih estera masnih kiselina mješovite kulture odnosno kontrola mikroalgi i plijesni. Najveći prinos lipida ostvaren je kultivacijom mješovite kulture plijesni *M. isabellina* i mikroalge *C. vulgaris* uz početni omjer spora i stanica 1:2700. U slučaju višestruko manjeg omjera, ko-kultivacija s istom plijesni rezultirala je značajno manjim prinosom lipida u odnosu na čistu kulturu plijesni. Iako u manjoj mjeri, pozitivan učinak na prinos lipida također je uočen u mješovitoj kulturi mikroalge i plijesni *A. fumigatus*. Rezultati provedenog eksperimenta ukazuju na potrebu za optimizacijom procesa, u svrhu boljeg razumijevanja interakcija fungalnog micelija i stanica mikroalgi. Prvenstveno se to odnosi na pronalaženje primjerenog početnog omjera stanica i spora. Literatura sugerira da je bioflokulaciju mikroalge *C. vulgaris*, kao i mnogih drugih vrsta moguće uspješno provesti pomoću plijesni *A. fumigatus* (Wrede i sur., 2014). Ovim eksperimentom dokazan princip bioflokulacije, međutim potrebno je daljnje istraživanje i definiranje uvjeta pri kojima dolazi do nastajanja peleta. Također, važno je istražiti širi raspon potencijalnih partnera sa svrhom usklađivanja brzina rasta mikroorganizama u mješovitoj zajednici. Rezultat adekvatne optimizacije bit će povećana učinkovitost izdvanjanja stanica mikroalgi, te uzajamno potpomognuta biosinteza lipida.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti:

1. Rast mikroalgi značajno ovisi o primijenjenom načinu kultivacije i izvoru ugljika. Mikroalgama *C. vulgaris*, *Chlamydomonas* sp. i *Scenedesmus* sp. pogoduje rast na heksozama i acetatu. Pentoze, većina disaharida i glicerol neprikladni su izvori ugljika za kultivaciju navedenih sojeva. Veća brzina rasta mikroalgi postiže se asimilacijom organskog izvora ugljika u usporedbi s anorganskim.
2. Molarni omjer ugljika i dušika u podlozi od presudne je važnosti za produktivnost sinteze biomase i željenih proizvoda. Visoki omjeri C:N pogoduju akumulaciji lipida i ugljikohidrata u biomasi *C. vulgaris*. Rastu stanica pogoduju niži C:N omjeri.
3. Heterotrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata omogućuje postizanje značajno veće produktivnosti sinteze biomase mikroalgi u odnosu na šaržni uzgoj u istim uvjetima. Sastav biomase mikroalge *C. vulgaris* se značajno mijenja ovisno o fazi uzgoja. Porast udjela lipida u biomasi u korelaciji je s iscrpljivanjem izvora dušika iz podloge, međutim ova pojava je znatno osjetljivija na količinu dostupnog izvora ugljika. Udio ukupnih klorofila smanjuje se u uvjetima limitacije izvorom dušika. Najzastupljenije masne kiseline u biomasi *C. vulgaris* su oleinska (C18:1 cis 9) i linolna (C18:2 cis 9,12), a njihov udio u ukupnim lipidima značajno raste tijekom limitacije dušikom.
4. Uzgojem mješovite kulture mikroalge *C. vulgaris* s plijesnima *A. niger*, *A. fumigatus* odnosno *M. isabellina* dokazan je princip bioflokulacije. Uočena je adsorpcija stanica mikroalge u površinskom sloju formiranih peleta plijesni. Međutim, postignuta je samo djelomična učinkovitost izdvajanja stanica. U mješovitoj zajednici mikroalge i plijesni *A. fumigatus* te *M. isabellina* ostvaren je veći prinos lipida u odnosu na pojedinačne čiste kulture.

## 6. LITERATURA

Allnutt, F.T., Kessler, B.A. (2015) Harvesting and Downstream Processing - and Their Economics. U: Biomass and Biofuels from Microalgae (Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., Bahri, P. A., ured.) Springer, Cham, str. 289-310.

Alves da Silva, A., Fonseca, G. G. (2018) Screening of an adapted culture medium composed by different carbon sources for heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using a microplate assay. *Acta Sci. Biol. Sci.* **40**, 1-6.

Andersen, R. A. (1992) Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers. Conserv.* **1**, 267-292.

Armstrong, G. A. (1998) Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *J. Photochem. Photobiol. B* **43**, 87-100.

Barkia, I., Saari, N., Manning, S. R. (2019) Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Mar. Drugs* **17** (5), 304-333. doi:10.3390/md17050304

Benavente-Valdés, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala A., Montañez, J. (2016) Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnol. Rep.* **10**, 117-125.

Bishop, N. I. (1971) Photosynthesis: The electron transport system of green plants. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 197-226. doi: 10.1146/annurev.bi.40.070171.001213

Biswal, A. K., Pattanayak, G. K., Padney, S. S., Leelavathi, S., Reddy, V. S., Govindjee, Tripathy B. C. (2012) Light Intensity-Dependent Modulation of Chlorophyll *b* Biosynthesis and Photosynthesis by Overexpression of Chlorophyllide *a* Oxygenase in Tobacco. *Plant Physiol.* **159**, 433-449. doi: 10.1104/pp.112.195859

Bleakley, S., Hayes, M. (2017) Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production. *Foods* **6**, 33-67. doi: 10.3390/foods6050033

Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** (8), 911-917.

Borowitzka, M. A. (2016) Systematics, taxonomy and species names: Do they matter?. U: The Physiology of Microalgae (Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A., ured.), Springer, Cham, str. 655-673.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14**, 557-577.
- Cheah, W. Y., Show, P. L., Chang, J. S., Ling, T. C., Juan, J. C. (2014) Biosequestration of atmospheric CO<sub>2</sub> and flue gas-containing CO<sub>2</sub> by microalgae. *Bioresour. Technol.* **184**, 190-201. doi: 10.1016/j.biortech.2014.11.026
- Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresour. Technol.* **110**, 510-516. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.125.
- Chen, C.Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., Chang, J. S. (2011) Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* **102**, 71–81. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.159
- Chen, F., Johns, M. R. (1991) A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. *J. Appl. Phycol.* **7**, 43-46
- Chen, H. H., Jiang, J. G. (2017) Lipid accumulation mechanisms in auto- and heterotrophic microalgae. *J. Agric. Food Chem.* **65** (37), 8099-8110. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03495
- Chen, J., Li, J., Dong, W., Zhang, X., Tyagi, R. D., Drogui, P., Surampalli, R. Y. (2018) The potential of microalgae in biodiesel production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **90**, 336-346. doi: 10.1016/j.rser.2018.03.073
- Cheng, D., Li, D., Yuan, Y., Zhou, L., Li, X., Wu, T., Wang, L., Zhao, Q., Wei, W., Sun, Y. (2017) Improving carbohydrate and starch accumulation in *Chlorella* sp. AE10 by a novel two-stage process with cell dilution. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 75-89.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294-306.
- Cho, S., Luong, T. T., Lee, D., Oh, Y. K., Lee, T. (2011) Effects of carbon and nitrogen sources on fatty acid contents and composition in the green microalga, *Chlorella* sp. 227. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1073-1080.
- Christenson, L., Sims, R. (2011) Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* **29** (6), 686-702.



- Combres, C., Laliberté, G., Reyssac, J. S., de la Noüe, J. (1994) Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Physiol. Plant.* **91** (4), 729-734.
- Craggs, R., Park, J., Heubeck, S., Sutherland, D. (2014) High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. *N. Z. J. Bot.* **52**, 60-73.
- Čorak, I. (2018) Izolacija i karakterizacija sojeva slatkovodnih mikroalgi. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi, R. J., Nouri H., Glozary, A. (2017) Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *G. J. E. S. M.* **3**, 217-230. doi: 10.22034/GJESM.2017.03.02.010
- Dehaghani, A. H. S., Pirouzfard, V. (2018) Investigation on the effect of microalgae *Chlorella* sp. and *Spirulina* on biodiesel production. *Pet. Chem.* **58**, 702-708.
- Dickey, L. A., Teter, B. B., Sampugna, J., Woods L. C. (2001) Comparison of a direct transesterification method and the Bligh and Dyer method to determine fatty acid content in striped bass tissues and diet. *N. Am. J. Aquacult.* **64**, 158-163.
- Dixon, C., Wilken, L. R. (2018) Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresour. Bioprocess.* **5**, 14-38. doi: 10.1186/s40643-018-0199-3
- Doucha, J., Lívanský, K. (2012) Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters. *J. Appl. Phycol.* **24**, 35-43. doi: 10.1007/s10811-010-9643-2
- Du, Z. Y., Zienkiewicz, K., Pol N. V., Ostrom, N. E., Benning, C., Bonito, G. M. (2019) Algal-fungal symbiosis leads to photosynthetic mycelium. *eLife* **8**, 1-22. doi: 10.7554/eLife.47815
- Dvořáková-Hladká, J. (1966) Utilization of organic substrates during mixotrophic and heterotrophic cultivation of algae. *J. Biol. Plant* **8**, 354-361.
- Dyo, Y. M., Purton, S. (2018) The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology* **164** (2), 113-121. doi: 10.1099/mic.0.000599
- Enamala, M., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhuyala, V., Velpuri, J., Kuppam, C. (2018) Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **94**, 49-68.

- Eriksen, N. T., (2012) Heterotrophic Microalgae in Biotechnology. U: Microalgae: Biotechnology, Microbiology, and Energy (Johansen M. N., ured.) Nova Science Publisher's, New York, str. 387-413.
- Fang, S. C. (2019) Metabolic Engineering and Molecular Biotechnology of Microalgae for Fuel Production. U: Biofuels from Algae, 2. izd. (Pandey, A., Chang, J.-S., Soccol, C. R., Lee, D.-J., Chisti, Y., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 89-107.
- Finkel, Z. V., Follows, M. J., Liefer, J. D., Brown, C. M., Benner, I., Irwin, A. J. (2016) Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. *PLoS One* **11**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155977>
- Gálová, E., Šalgovičová, I., Demko, V., Mikulová, K., Ševčovičová, A., Slovakova, L., Kyselá, V., Hudák, J. (2008) A short overview of chlorophyll biosynthesis in algae. *Biologia* **63**, 947-951. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00246.x
- Golbeck J. H. (1994) Photosystem I in Cyanobacteria. U: The Molecular Biology of Cyanobacteria (Bryant, D. A., ured.) Springer, Dordrecht, str. 320-354.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., Simões, M. (2016) A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* **24**, 403-415. doi: 10.1016/j.algal.2016.11.008
- Griffiths, D. J. (2013) *Microalgae and Man*. Nova Science Publishers, New York, str. 162-201.
- Gultom, S., Hu, B. (2013) Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. *Energies* **6** (11), 5921-5939. doi:10.3390/en6115921
- Heimann, K., Huerlimann R. (2015) Microalgal Classification: Major classes and genera of commercial microalgal species. U: Handbook of marine microalge (Se-Kwon, K., ured.) Academic press, Cambridge, str. 25-41.
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J. S. (2013) Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresour. Technol.* **135**, 157-165.
- Hu, B., Ruan, R., Zhang, J., Zhou, W. (2013) Microalgae Culture And Harvest. US Patent 61,547,177.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2018) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* **54** (4), 621-639. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x



- Ikaran, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., Castañón, S. (2015) The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Res.* **10**, 134-144.
- Jeffrey, S. W., Humphrey, G. F. (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls *a*, *b*, *c* and *c2* in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.* **167**, 191-194.
- Kassim, E. S. A. (1982) Cellulase Enzyme from *Aspergillus niger*. *Microbiol. Immunol.* **26**, 449-454.
- Khan, M. I., Shin, J. H., Kim, J. D. (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* **17**, 36-57.
- Khozin-Goldberg, I. (2016) Lipid metabolism in microalgae. U: *The Physiology of Microalgae* (Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A., ured.) Springer, Cham, str. 413-484.
- Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G. (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* **6**, 52-63. doi: 10.1016/j.algal.2014.09.002
- Komušar, L. (2019) Heterotrofni i miksotrofni uzgoj mikroalge *Chlamydomonas* sp. Diplomski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Lam, M. K., Lee, K. T. (2013) Scale-up and Commercialization of Algal Cultivation and Biofuel Production. U: *Biofuels from Algae* (Pandey, A., Lee, D. J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.) Elsevier, Burlington, str. 261-286.
- Lee, J., Cho, D.-H., Ramanan, R., Kim, B.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S. (2013) Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Techn.* **131**, 195-201. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.130
- Lian, J., Wijffels, R. H., Smidt, H., Sipkema, D. (2018) The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microb. Biotechnol.* **11** (5), 806-818. doi: 10.1111/1751-7915.13296
- Magdouli, S., Brar, S. K., Blais, J. F. (2016) Co-culture for lipid production: Advances and challenges. *Biomass Bioenerg.* **92**, 20-30.

- Malavasi, V., Škaloud, P., Rindi, F., Tempesta, S., Paoletti, M., Pasqualetti, M. (2016) DNA-Based Taxonomy in Ecologically Versatile Microalgae: A re-evaluation of the species concept within the coccoid green algal genus *Coccomyxa* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *PLoS One* **11**, 1-25.
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D. (2012) Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 631-645.
- Marques, A. E., Miranda, J. R., Batista, A. P., Gouveia, L. (2012) Microalgae Biotechnological Applications: Nutrition, Health and Environment. U: Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy (Johansen, M. N., ured.), Nova Science Publishers Inc., New York, str. 1-60.
- Masojídek, J., Torzillo, G., Koblížek, M. (2013) Photosynthesis in Microalgae. U: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2. izd. (Richmond, A., Hu, Q., ured.), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, str. 21-37.
- Mayers, J. J., Flynn, K. J., Shields, R. J. (2013) Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresour. Technol.* **148**, 215-220.
- Metting, F.B. (1996) Biodiversity and application of microalgae. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 477-489.
- Miranda, A. F., Taha, M., Wrede, D., Morrison, P. I., Ball, A. S., Stevenson, T., Mouradov, A. (2015) Lipid production in association of filamentous fungi with genetically modified cyanobacterial cells. *Biotechnol. Biofuels.* **8**, 179-193. doi: 10.1186/s13068-015-0364-2
- Mitra, D., van Leeuwen, J. H., Lamsal, B. (2012) Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Res.* **1**, 40-48.
- Mitra, M., Mishra, S. (2018) Effect of glucose on growth and fatty acid composition of an euryhaline eustigmatophyceae *Nannochloropsis oceanica* under mixotrophic culture condition. *Bioresour. Technol.* **3**, 147-153. doi: 10.1016/j.biteb.2018.07.013
- Mohan, S. V., Devi, M. P., Subhash, G. V., Chandra, R. (2014) Algae oils as fuels. U: Biofuels from Algae (Pandey, A., Lee, D. J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.) Elsevier, Burlington, str. 155-187.

- Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., Bahri, P. A. (2015) Past, Present and Future of Microalgae Cultivation Developments. U: Biomass and Biofuels from Microalgae (Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., Bahri, P. A., ured.) Springer, Cham, str. 1-18.
- Morales-Sánchez, D., Martínez-Rodríguez, O. A., Kyndt, J., Martínez, A. (2014) Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 1-9. doi: 10.1007/s11274-014-1773-2
- Muradov, N., Taha, M., Miranda, A. F., Wrede, D., Kadali, K., Gujar, A., Stevenson, T., Ball, A. S., Mouradov, A. (2015) Fungal-assisted algal flocculation: application in wastewater treatment and biofuel production. *Biotechnol. Biofuels.* **15**, 8-24. doi: 10.1186/s13068-015-0210-6
- Ogbonna, J. C., McHenry, M. P. (2015) Culture Systems Incorporating Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae. U: Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology (Moheimani, N. R., McHenry, M. P., de Boer, K., Bahri, P. A., ured.), Springer International Publishing, Cham, str. 63-74.
- Ördög, V., Stirk, W. A., Bálint, P., van Staden, J., Lovász, C. (2012) Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* **24**, 907–914.
- Padmaperuma, G., Kapoore, R. V., Gilmour, D. J., Vaidyanathan S. (2017) Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38** (5), 690-703. doi: 10.1080/07388551.2017.1390728
- Paes, C. R. P. S., de Faria G. R., Tinoco, N., Castro D. J. F. A. (2016) Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **44**, 275-292.
- Pal, P., Chew, K. W., Yen, H. W., Lim, J. W., Lam, M. K., Show, P. L. (2019) Cultivation of oily microalgae for the production of third-generation biofuels. *Sustainability* **11**, 1-16.
- Perez-Garcia, O., Bashan, Y. (2015) Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. U: Algal Biorefineries (Prokop A., Bajpai R., Zappi M., ured.), Springer, Cham, str. 61-131. doi:10.1016/j.watres.2010.08.037

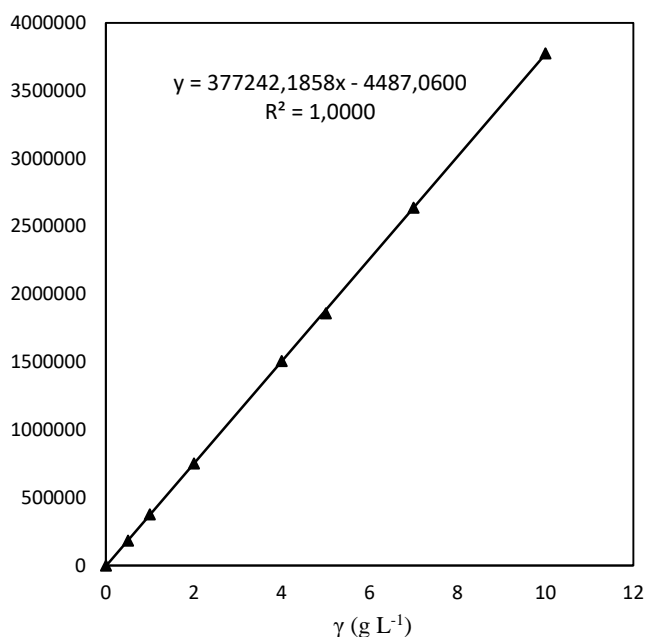
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., Bashan, L. E., Bashan, Y. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* **45**, 11-36. doi: 10.1007/978-3-319-20200-6\_3
- Powell, R. J., Hill, R. T. (2013) Rapid aggregation of biofuel-producing algae by the bacterium *Bacillus* sp. strain RP1137. *Appl. Environ. Microbiol.* **79** (19), 6093– 6101. doi: 10.1128/AEM.01496-13
- Pröschold, T., Leliaert, F. (2007) Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. U: *Unravelling the algae: The past, present, and future of algal systematics* (Brodie, J., Lewis, J., ured.), CRC Press, Boca Raton, str.123-153.
- Pulz, O., Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 635-648.
- Rajkumar, R., Yaakob, Z. (2013) *The Biology of Microalgae. U: Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products* (Bux, F., ured.) Taylor and Francis, Boca Raton, str. 7-17.
- Ramaraj, R., Dussadee, N. (2015) Biological purification processes for biogas using algae cultures: A review. *International Journal of Sustainable and Green Energy* **4**, 20-32. doi: 10.11648/j.ijrse.s.2015040101.14
- Rashid, N., Lee B., Chang, Y. K. (2019) Recent Trends in Microalgae Research for Sustainable Energy Production and Biorefinery Applications. U: *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment* (Alam A., Wang Z., ured.), Springer, Singapore, str. 3-21.
- Rebah, F. B., Mnif, W., Siddeeg, S. M. (2018) Microbial flocculants as an alternative to synthetic polymers for wastewater treatment: A review. *Symmetry* **10**, 556-575. doi:10.3390/sym10110556
- Renuka, N., Guldhe, A., Prasannab, R., Singha, P., Buxa, F. (2018) Microalgae as multi-functional options in modern agriculture: current trends, prospects and challenges. *Biotechnol. Adv.* **36** (4), 1255-1273
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., Tava, A. (2019) Microalgal biostimulants and biofertilisers in crop productions. *Agronomy* **9** (4), 192-214. doi: 10.3390/agronomy9040192

- Scarsella, M., Belotti, G., De Filippis, P., M. Bravi (2010) Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors. *Chem. Eng. Trans.* **20**, 85-90.
- Sexton, J. P., Lomas, M. W. (2018) Microalgal systematics. U: Microalgae in Health and Disease Prevention (Levine, I., Fleurence J., ured.), Academic Press, Cambridge, str. 73-107.
- Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., Joshi G. (2016) Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **216**, 793-800. doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.013
- Skjånes, K., Rebours, C., Lindblad, P. (2013) Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Crit. Rev. Biotechnol.* **33** (2), 172-215. doi: 10.3109/07388551.2012.681625
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., Stanley, M. S. (2013) A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresour. Technol.* **129**, 51-57.
- Stephenson, A. L., Dennis, J. S., Howe, C., J., Scott, S. A., Smith, A. G. (2010) Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels* **1**, 47-58.
- Uggetti, E., Passos, F., Solé, M., Garfi, M., Ferrer, I. (2016) Recent achievements in the production of biogas from microalgae. *Waste Biomass Valor.* **8**, 129–139. doi: 10.1007/s12649-016-9604-3
- Ummalyma, S. B., Gnansounou, E., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., Pandey, A., Sahoo, D. (2017) Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae – An overview. *Bioresour. Technol.* **242**, 227–235.
- Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013a) Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013b) Determination of total lipids as fatty acid methyl esters (FAME) by in situ transesterification : laboratory analytical procedure (LAP), issue date December 2, 2013. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory.

- Veillette M., Giroir-Fendler A., Faucheux, N., Heitz, M. (2017) Biodiesel from microalgae lipids: from inorganic carbon to energy production. *Biofuels* **9** (2), 175-202. doi: 10.1080/17597269.2017.1289667
- Vidotti, A.D. S., Coelho, R. S., Franco, L. M., Franco, T. T. (2014) Miniaturized culture for heterotrophic microalgae using low cost carbon sources as a tool to isolate fast and economical strains. *Chem. Eng. Trans.* **38**, 325-329. doi: 10.3303/CET1438055
- Vieira Costa, J. A., Greque de Moraes, M. (2013) An Open Pond System for Microalgal Cultivation. U: *Biofuels from Algae* (Pandey, A., Lee, D.-J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.) Elsevier, Burlington, str. 1-22.
- Wang, C., Lan, C. Q. (2018) Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnol Adv.* **36**, 986-1002.
- Wang, J., Yang, H., Wang F. (2014) Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172** (7), 3307-3329. doi: 10.1007/s12010-014-0729-1
- Wang, T., Tian X., Liu, T., Wang, Z., Guan, W., Guo, M., Chu, J., Zhuang, Y. (2017) A two-stage fed-batch heterotrophic culture of *Chlorella protothecoides* that combined nitrogen depletion with hyperosmotic stress strategy enhanced lipid yield and productivity. *Process Biochem.* **60**, 74-83.
- Wrede, D., Taha, M., Miranda, A. F., Kadali, K., Stevenson, T., Ball, A. S., Mouradov, A. (2014) Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PLoS One* **9** (11), 1-22.
- Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., Chang, J. S. (2013) Design of Photobioreactors for Algal Cultivation. U: *Biofuels from Algae* (Pandey, A., Lee, D.- J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.) Elsevier, Burlington, str. 23-45.
- Zienkiewicz, K., Du, Z. Y., Ma, W., Vollheyde, K., Benning, C. (2016) Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae – Molecular, cellular and physiological insights. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 1269-1281.

## 7. PRILOZI

**Prilog 7.1.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze (HPLC).

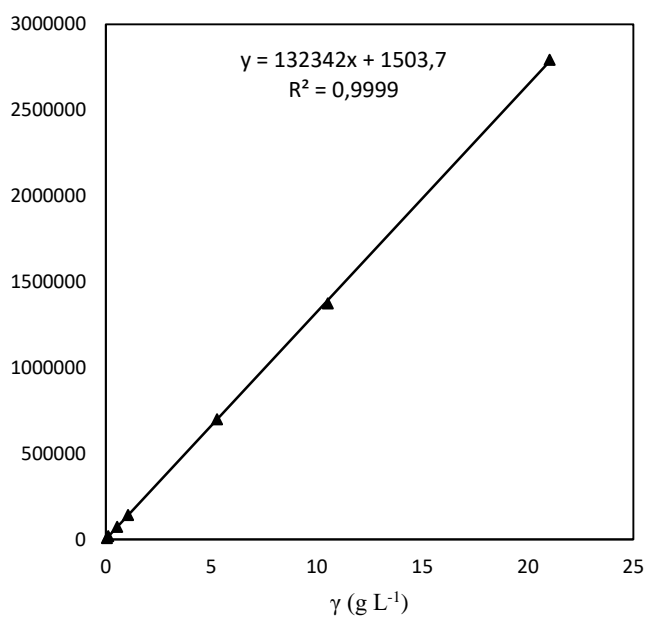


**Prilog 7.2.** Apsorpcijske vrpce biomase mikroalgi u IR području.

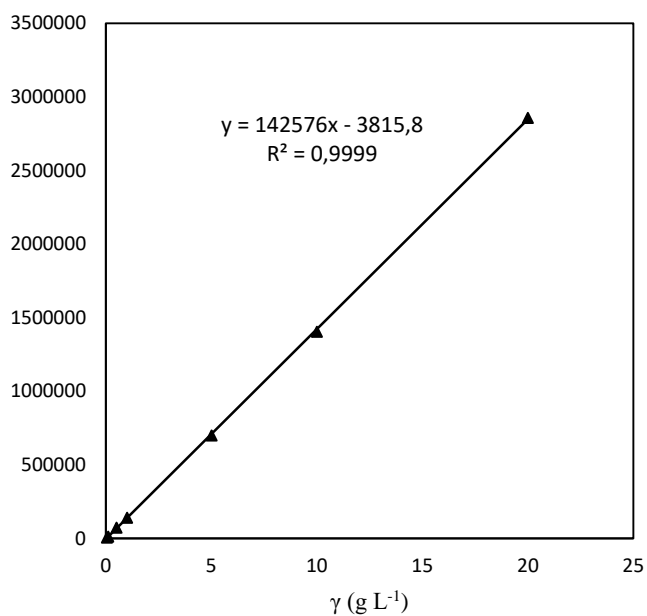
valni broj [ $\text{cm}^{-1}$ ]	karakteristična vrpca	funkcijska skupina
3400 – 3200	O – H/ N – H	voda, protein
2960	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> metilna skupina
2930	CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> metlienska skupina
2850	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> metilne i CH <sub>2</sub> metilenske skupine
1745	C = O	esteri lipida i masnih kiselina
1655	C = O	amid I
1545	N – H, C – N	amid II
1455	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> metilne i CH <sub>2</sub> metilenske skupine
1390	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> / C – O	CH <sub>2</sub> i CH <sub>3</sub> skupine iz proteina/ karboksilne skupine
1240	P = O	fosfodiesteri nukleinskih kiselina i fosfolipidi
1200 - 900	C – O – C	polisaharidi i siloksani
1075 I 950	Si – O	siloksani, silikati
980 - 940	P – O – P	polifosfati

**Prilog 7.3.** Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije monosaharida (UPLC).

a) glukoza

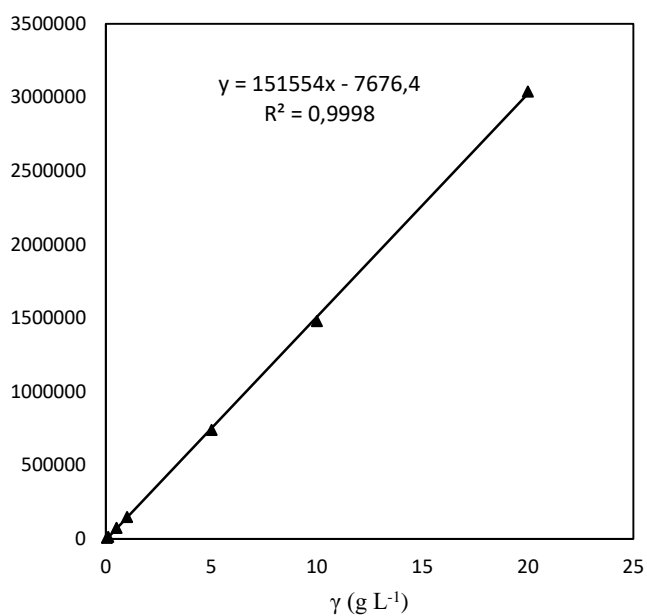


b) ksiloza

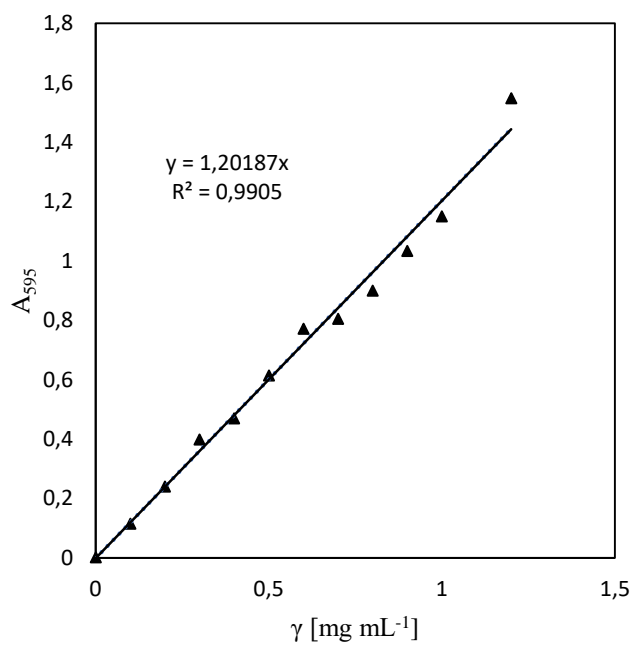




c) arabinoza



**Prilog 7.4.** Baždarni dijagrami za određivanje koncentracije proteina (Bradford).




**Prilog 7.5.** Udjeli proteina u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata (Lowry).

$$y = 2,21498x + 0,05068$$

t [dan]	w (proteini) [%]
0	11,9532
1	18,6902
2	10,3680
3	2,9965
4	1,2951
5	0,7770
6	0,4159
7	0,0470
8	0,3007
9	0,1219
10	0,2560

### **Izjava o izvornosti**

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



---